



Modulateurs du transport vésiculaire du glutamate : développement d'outils pharmacologiques et de diagnostic pour la maladie d'Alzheimer

Franck-Cyril Favre-Besse

► To cite this version:

Franck-Cyril Favre-Besse. Modulateurs du transport vésiculaire du glutamate : développement d'outils pharmacologiques et de diagnostic pour la maladie d'Alzheimer. Autre. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05P639 . tel-00923157

HAL Id: tel-00923157

<https://theses.hal.science/tel-00923157>

Submitted on 2 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

De l'Université Paris Descartes

Ecole Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

Modulateurs du transport vésiculaire du glutamate : développement d'outils pharmacologiques et de diagnostic pour la maladie d'Alzheimer

Présentée par :

Franck-Cyril FAVRE-BESSE

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques

CNRS UMR 8601,

Université Paris-Descartes

45, rue des Saints-Pères, 75 270 Paris Cedex 06

Soutenue le 13 décembre 2012 devant le jury composé de :

| | |
|---------------------------------|---------------------|
| Dr. Martine DEMEUNYNCK | Rapporteur |
| Dr. Jean DESSOLIN | Rapporteur |
| Dr. Bruno GASNIER | Examineur |
| Dr. Marie-Noëlle RAGER | Examinatrice |
| Dr. Francine ACHER | Directrice de Thèse |
| Dr. Nicolas PIETRANCOSTA | Co-Directeur |

A Céline,

A mes Parents,

A ma Grand-Mère qui me manque.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma Directrice de thèse, Mme Francine ACHER, de m'avoir accueilli au sein de son Laboratoire, m'avoir confié un sujet novateur et passionnant, m'avoir accordé sa confiance et une grande liberté de travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à M. Nicolas PIETRANCOSTA, mon co-directeur, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour.

Nico, un immense merci pour ta patience, ta gentillesse et ta disponibilité, même dans les moments difficiles. Pendant près de quatre ans, tu as toujours été présent pour me donner de précieux conseils et me laisser faire mes propres erreurs. Merci pour toute l'attention que tu as apportée à la correction de ce manuscrit. Afin de t'exprimer toute ma gratitude, j'aimerais te faire un câlin...

Un immense merci à Isabelle, notre « maman » à tous. Je te suis très reconnaissant pour les longues heures que tu as accordées à la relecture de ma thèse et aux nombreux conseils que tu m'as donnés. Tu m'as appris la différence entre « par contre » et « en revanche »..... et comment déboccher au TFA.

Merci à mes Collègues et Amis :

Dédé, tu m'as facilité la vie au labo et permis de trouver tout ce que je n'arrivais pas à chercher ! Merci pour la couleur de ton visage qui te trahit, de m'avoir montré que les ourlets d'un pantalon peuvent se faire avec du scotch et pour ta sempiternelle ficelle...

Mon Lilou, sans toi les journées auraient été moins fun. Merci d'être toi-même et de m'avoir supporté douze heures par jour. Excuse-moi de te délaisser mais courage, tu vois le bout du tunnel...

A Nico, mon copain de M2 et de thèse, qui a su m'expliquer les métaux de transition. Tu es le meilleur prof que je connaisse ! Merci pour tout et surtout les bons moments passés ensemble.

Younes, dit la « rascasse », qui a particulièrement aimé la synthèse des bleus et m'a fait découvrir que le brome faisait gratter la gorge... et pour ton humour, j'ai enfin un concurrent sérieux...

Merci à Albane pour son travail et de m'avoir permis d'utiliser ses molécules dans ma thèse.

Merci à Bruno les mains d'argent (!) ; à Sara de m'avoir fait pratiquer l'anglais ; à Isabelle et les repas particulièrement longs ainsi que pour l'odeur de son réactif de Lawesson ; à Thomas et ses stylos à durée de vie limitée ; à Laëtitia pour le « lap dance » ; à Sheldon et Antoine pour leurs participations à ce sujet. Comme le dirait Toinette, magnifique !

Je tiens à exprimer ma gratitude à Mme Martine DEMEUNYNCK et M. Jean DESSOLIN qui me font l'honneur d'être les rapporteurs scientifiques de ma thèse ainsi qu'à Mme Marie-Noëlle RAGER et M. Bruno GASNIER d'examiner mon travail.

Mme RAGER, remerciements pour le temps que vous m'avez accordé. Votre expertise a permis à mon travail de faire un grand bond en avant.

Je remercie aussi M. Salah El MESTIKAWY et son équipe qui ont testé les molécules synthétisées et tout particulièrement Tiphaine et Elodie. Merci à Mme Isabelle BRABET pour l'évaluation sur les mGluRs.

A tous les membres de l'UMR, pour ces années passées à vos côtés, les nombreuses interactions scientifiques, les bons moments et les fous rires que nous avons pu partager. Un remerciement tout particulier à Assia, « miss masse », qui donne les spectres plus vite que son ombre.

Enfin, un grand merci à tous mes proches. Merci à mes Parents et ma Grand-Mère de m'avoir épaulé tout au long de ma vie et permis d'atteindre mes ambitions. Merci à Céline, si ce manuscrit est écrit c'est aussi grâce à toi. Comme à ton habitude, tu as été exceptionnelle pendant la période de rédaction. Pardon de t'avoir délaissée pour mon ordinateur...

Merci au chlorure de sodium qui m'en a fait voir de toutes les couleurs.

Et merci à vous, lecteurs de cette thèse.

Table des matières

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE

| | | |
|----------------|--|-----------|
| I. | LE GLUTAMATE | 1 |
| I.1 | GENERALITES | 1 |
| I.2 | UN ACIDE AMINÉ NON-ESSENTIEL | 2 |
| I.3 | NEUROTRANSMETTEUR EXCITATEUR MAJORITAIRE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL | 4 |
| I.4 | NEUROTOXICITÉ DU GLUTAMATE | 4 |
| II. | LE SYSTEME GLUTAMATERGIQUE | 7 |
| II.1 | LE CYCLE DU GLUTAMATE | 7 |
| II.2 | DES RECEPTEURS IONOTROPIQUES AUX RECEPTEURS METABOTROPIQUES | 8 |
| II.2.a | <i>Les récepteurs ionotropiques</i> | <i>8</i> |
| II.2.b | <i>Les récepteurs métabotropiques</i> | <i>10</i> |
| II.3 | LES TRANSPORTEURS D'ACIDES AMINÉS EXCITATEURS | 12 |
| II.3.a | <i>Généralités et cycle des EAATs</i> | <i>12</i> |
| II.3.b | <i>Les différents sous-types d'EAATs</i> | <i>13</i> |
| II.3.c | <i>Distribution et fonctions physiologique des EAATs</i> | <i>14</i> |
| II.3.d | <i>Ligands des EAATs</i> | <i>15</i> |
| II.3.e | <i>Les EAATs comme nouvelle cible thérapeutique</i> | <i>18</i> |
| II.4 | LE CYCLE GLUTAMATE-GLUTAMINE DANS LES ASTROCYTES | 19 |
| II.4.a | <i>Généralités sur les astrocytes</i> | <i>19</i> |
| II.4.b | <i>Le cycle glutamate-glutamine</i> | <i>19</i> |
| III. | LES TRANSPORTEURS VESICULAIRES DU GLUTAMATE | 25 |
| III.1 | IDENTIFICATION DES VGLUTS | 25 |
| III.2 | VGLUTS ET PHYLOGÉNIE | 26 |
| III.2.a | <i>Généralités</i> | <i>26</i> |
| III.2.b | <i>SLC17</i> | <i>27</i> |
| III.2.c | <i>SLC18</i> | <i>28</i> |
| III.2.d | <i>SLC32</i> | <i>29</i> |
| III.2.e | <i>Conclusions</i> | <i>29</i> |
| III.3 | DISTRIBUTIONS DES TRANSPORTEURS VESICULAIRES DU GLUTAMATE | 29 |
| III.3.a | <i>Distribution au niveau cérébral</i> | <i>29</i> |

| | | |
|---------|---|-----------|
| III.3.b | Les autres distributions des transporteurs vésiculaires du glutamate..... | 32 |
| III.3.c | Conclusions | 34 |
| III.4 | LES VGLUTs DURANT LE DEVELOPPEMENT POST-NATAL..... | 35 |
| III.4.a | VGLUT1 et VGLUT2 | 35 |
| III.4.b | VGLUT3..... | 36 |
| III.5 | PROPRIÉTÉS DES VGLUTs..... | 36 |
| III.6 | REGULATION DES VGLUTs..... | 38 |
| III.7 | VGLUTs ET PATHOLOGIES..... | 39 |
| III.7.a | Implications des VGLUTs dans diverses pathologies..... | 39 |
| III.7.b | Implications des VGLUTs dans la maladie d'Alzheimer..... | 40 |
| IV. | LA MALADIE D'ALZHEIMER..... | 43 |
| IV.1 | INTRODUCTION | 43 |
| IV.2 | PROTEINES ANORMALES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER..... | 44 |
| IV.2.a | Le peptide β -amyloïde..... | 44 |
| IV.2.b | La protéine Tau | 46 |
| IV.3 | IMPLICATION DE LA SYNAPSE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER | 48 |
| IV.3.a | Défaillances synaptiques..... | 48 |
| IV.3.b | Implications des neurotrophines et des récepteurs à acétylcholine | 49 |
| IV.4 | LE SYSTEME GLUTAMATERGIQUE DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER | 50 |
| IV.4.a | Implications des transporteurs du glutamate..... | 50 |
| IV.4.b | Implications des récepteurs du glutamate..... | 51 |
| IV.5 | LES DIFFÉRENTES VOIES THÉRAPEUTIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER | 53 |
| IV.5.a | Les antagonistes du glutamate | 53 |
| IV.5.b | Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase | 55 |
| IV.6 | DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER | 57 |
| IV.6.a | Outils d'évaluations | 57 |
| IV.6.b | Imagerie cérébrale et utilisation de biomarqueurs..... | 58 |
| V. | PHARMACOLOGIE DES VGLUTs | 61 |
| V.1 | SUBSTRATS DES VGLUTs..... | 61 |
| V.2 | INHIBITEURS COMPÉTITIFS DES VGLUTs | 61 |
| V.2.a | Les analogues d'acides aminés..... | 61 |
| V.2.b | Les colorants azoïques | 63 |
| V.2.c | Inhibiteur indirect naturel | 66 |
| V.2.d | Les inhibiteurs canaux et de la V-ATPase..... | 66 |
| V.2.e | Rose Bengale : un inhibiteur non compétitif..... | 67 |
| V.3 | CONCLUSIONS | 68 |
| VI. | PRÉSENTATION DES AXES DE TRAVAIL..... | 69 |

| | | |
|---------------|---|------------|
| VII. | SYNTHESE DE COLORANTS..... | 73 |
| VII.1 | LE ROSE BENGAL ET LES DERIVES DE FLUORESCÉINE | 73 |
| VII.1.a | Introduction | 73 |
| VII.1.b | Synthèse du Rose Bengale et des dérivés de fluorescéine | 76 |
| VII.1.c | Les analogues du Rose Bengale : un équilibre pH-dépendant | 88 |
| VII.1.d | Conclusions | 99 |
| VII.2 | LE BLEU TRYPAN ET SES DERIVES | 100 |
| VII.2.a | Introduction | 100 |
| VII.2.b | Synthèse d'anilines et de benzidines fonctionnalisées | 105 |
| VII.2.c | Réaction de diazotation | 118 |
| VII.2.d | Couplage azoïque..... | 135 |
| VII.2.e | Développement et synthèses d'analogues du Bleu Trypan | 149 |
| VII.3 | PURIFICATION ET CARACTERISATION DES COLORANTS..... | 158 |
| VII.3.a | Introduction | 158 |
| VII.3.b | Purification des colorants..... | 159 |
| VII.3.c | Caractérisation des colorants azoïques | 163 |
| VII.4 | CONCLUSIONS | 169 |
| VIII. | EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES COLORANTS..... | 171 |
| VIII.1 | INTRODUCTION..... | 171 |
| VIII.2 | EVALUATION DE LA CAPACITE INHIBITRICE DES ANALOGUES DE ROSE BENGAL | 172 |
| VIII.2.a | Pharmacologie des transporteurs vésiculaires du glutamate | 172 |
| VIII.2.b | Etude des relations structure-activité | 176 |
| VIII.2.c | Pharmacologie des analogues de Rose Bengale sur VMAT2 et VACHT | 179 |
| VIII.2.d | Conclusions | 181 |
| VIII.3 | EVALUATION DE LA CAPACITE INHIBITRICE DES ANALOGUES DU BLEU TRYPAN..... | 183 |
| VIII.3.a | Pharmacologie des transporteurs vésiculaires du glutamate | 183 |
| VIII.3.b | Pharmacologie des récepteurs métabotropiques du glutamate | 187 |
| VIII.4 | CONCLUSIONS | 188 |
| | CONCLUSION GENERALE | 189 |
| | EXPERIMENTAL PART | 191 |
| IX.1 | SYNTHESIS OF ROSE BENGAL ANALOGS | 195 |
| IX.1.a | Synthesis of fluorescein analogs..... | 196 |
| IX.1.b | Synthesis of Rose Bengal analogs..... | 200 |
| IX.1.c | Rose Bengal etherification | 203 |
| IX.1.d | Eosin B etherification | 205 |
| IX.1.e | Rose Bengal esterification | 206 |
| IX.1.f | Eosin B esterification..... | 207 |

| | | |
|--|---|------------|
| IX.1.g | <i>Eosin B decarboxylation</i> | 208 |
| IX.2 | SYNTHESIS OF TRYPAN BLUE ANALOGS | 209 |
| IX.2.a | <i>Anilines and Benzidine synthesis</i> | 212 |
| IX.2.b | <i>Diazotation</i> | 228 |
| IX.2.c | <i>Azoic coupling</i> | 237 |
| ANNEXES | | 285 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | | 287 |

Abréviations et Signes

Abréviations et signes

¹³C : ¹³Carbone
¹⁸FDG : ¹⁸Fluorodéoxyglucose
¹⁹F : ¹⁹Fluor
¹H : ¹Proton
¹H-MRS : Signal de résonance magnétique du proton
AChE : Acétylcholinestérase
AChEI : Inhibiteur d'acétylcholinestérase
AcOH : Acide acétique
ADP : Adénosine diphosphate
AICD : Domaine intracellulaire de la protéine précurseur de l'amyloïde
AMPA : Acide α-Amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APP : Protéine précurseur du peptide amyloïde
Arg : Arginine
ARNm : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique complémentaire
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASCT : Transporteur d'acides aminés neutres sodium-dépendant
ATD : Domaine amino-terminal
ATP : Adénosine triphosphate
Aβ : β-amyloïde
BACE : Enzyme de clivage de l'APP
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BDNF : Facteur neurotrophique dérivant du cerveau
BHE : Barrière hémato-encéphalique
BNPI : Transporteur spécifique Na⁺-dépendant de phosphate inorganique
Boc : *tert*-butoxycarbonyl
BT : Bleu Trypan
BuChE : Butyrylcholinestérase
BuOH : Butanol
CA : Corne d'Ammon
CaMKII : Protéine kinase 2 calcium-calmoduline
CE₅₀ : Concentration excitatrice à 50 %
CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50 %
CLC : Canal chlore
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
CRP : Protéine C réactive
CTAB : Bromure de cetyl triméthylammonium
D-ASP : D-aspartate
DBU : 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DHK : Dihydrokaïnique
DIAD : Diisopropyl azodicarboxylate
DIDS : Acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique
DIEA : N,N-diisopropylethylamine
DLT : Dépolarisation à long terme
DMF : Diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DO : Densité optique

Abréviations et signes

EAAC : Transporteur d'acides aminés excitateurs
EAAT : Transporteur d'acides aminés excitateurs
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthyllaminopropyl)carbodiimidehydrochloride
ERK : Protéine kinase
ESI : Electrospray
EtBr : Bromure d'éthyle
EtOH : Ethanol
 F : Constante de Faraday
Fmoc : Fluorénylméthoxyloxycarbonyl
GABA : Acide gammaaminobutyrique
GDH : Glutamate déshydrogénase
GIRK : Courant potassique rectifiant activé par les protéines G
GLAST : Transporteur glutamate-aspartate
Gln : Glutamine
GLP : Peptide ressemblant au glucagon
GLT : Transporteur glutamate
Glu : Glutamate
GS : Glutamine synthétase
GSK-3 β : Glycogène synthase kinase 3
HAS : Haute autorité de sûreté
His : Histidine
HMBC : Corrélation proton-carbone à longue distance
HMQC : Corrélation proton-carbone à courte distance
HOBt : Hydroxybenzotriazole
HP : Repliement en épingle à cheveux
HupA : Huperzine A
HupB : Huperzine B
IADL : Activités instrumentales de la vie quotidienne
IDE : Enzyme de dégradation de l'insuline
iGluR : Récepteur ionotrope du glutamate
IRM : Imagerie par résonance magnétique
KA: Kaïnate
 K_m : Constante de Michaelis
L-ASP : L-aspartate
LSP : Laboratoire des Saints Pères
M1 : Récepteur muscarinique de type 1
MA : Maladie d'Alzheimer
MBD : Domaine de liaison aux microtubules
MeOH : Méthanol
mGluR: Récepteur métabotrope du glutamate
MHz : Mégahertz
MIS : Memory Impairment State Screen
MMSE : Mini-Mental State Examination
NAA : *N*-acétyl-aspartate
NGF : Facteur de croissance nerveux
NMDA : *N*-méthyl-D-aspartate
NOESY : Corrélation proton-proton dans l'espace
NPT : Transporteur phosphate Na⁺-dépendant
NTS : Neurotrophine
PAG : Glutaminase
pH: Potentiel d'hydrogène
PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIB : Composé B de Pittsburgh
pKa : Potentiel d'acidité
PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C
 PLT : Potentialisation à long terme
 ppm : Partie par million
 PyBop : Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate
 QDC : Acide 2,4-quinoléinedicarboxylique
R : Constante des gaz parfaits
 RB : Rose Bengale
 RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
 RMN : Résonance magnétique nucléaire
 ROS : Espèce réactive de l'oxygène
 SAMP8 : Souris à sénescence accélérée
SE_{Ar} : Substitution électrophile aromatique
 SITS : Acide 4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique
 SLA : Sclérose latérale amyotrophique
 SLC : Solute carrier
SN_{Ar} : Substitution nucléophile aromatique
 SNARE : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
 SNAT : Anti sérotonine *N*-acétyltransférase
 SNC : Substance noire compacte
 SNC : Système nerveux central
 STh : Noyau sous-tahalmique
T : Température absolue
 TBOA : Acide DL-*thréo*-β-benzyloxyaspartique
 TCA : Cycle des acides tricarboxyliques
 TEMP : Tomographie d'émission monophotonique
 TEP : Tomographie à émission de positrons
 THF : Tétrahydrofurane
 TSH : Thyroestimuline hypophysaire
 USFDA : Agence américaine des médicaments
 UV : Ultra-violet
 VACHT : Transporteur vésiculaire d'acétylcholine
v-ATPase: Pompe à protons vésiculaire
 VEAAT : Transporteur vésiculaire d'acides aminés excitateurs
 VFT : Venus Fly Trap
 VGAT : Transporteur vésiculaire de GABA
 VGLUT : Transporteur vésiculaire du glutamate
 VIAAT : Transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteurs
 VIH : Virus d'immunodéficience humaine
 VMAT : transporteur vésiculaire de monoamines
 VNUT : Transporteur vésiculaire de nucléotides
 VP : Pallidum ventral
 α7-nAChR : Récepteur α-7 nicotinique pré-synaptique de l'acétylcholine

Introduction Générale

1. Le glutamate

I. Le Glutamate

I.1 Généralités

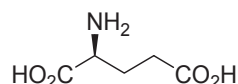


Figure I-1 : L'acide glutamique

L'acide glutamique, (**Figure I-1**) ou glutamate à pH physiologique, est un des vingt-deux acides- α -aminés naturels constituant les protéines. Il est par ailleurs l'acide aminé le plus abondant de l'alimentation humaine. Connu sous le code E620, le glutamate est utilisé comme exhausteur de goût des aliments et est additionné aux préparations alimentaires. En 1908, un scientifique japonais Kikunae Ikeda lui attribua le goût « umami » qui signifie savoureux, complétant les goûts salé, sucré, amer et acide. En effet, le glutamate est couramment utilisé dans la cuisine asiatique.

Il a fallu plusieurs décennies pour découvrir ses propriétés de neurotransmetteur.

Les premières études sur un « fluide nerveux » de nature électrique remontent au XVIII^{ème} siècle notamment grâce aux travaux de Luigi Galvani. Ce n'est qu'à partir de la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle que de nombreuses recherches furent menées et ce par le biais des frères Weber. Ils démontrèrent alors l'inhibition exercée sur le cœur par le nerf pneumogastrique (nerf vague ou nerf X).

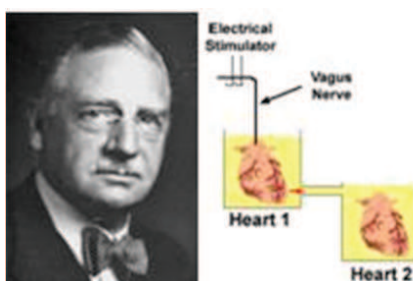


Figure I-2 : Otto Loewi et la découverte de la neurotransmission

Jusqu'au début du XX^{ème} siècle, la transmission de l'influx nerveux était encore supposée comme exclusivement électrique. Ce n'est qu'en 1921, qu'Otto Loewi (prix Nobel de médecine de physiologie ou de médecine en 1936) mit en évidence la première neurotransmission chimique. Cette découverte a été possible grâce à une expérience menée sur deux cœurs de grenouille qui lui a permis de découvrir les effets de l'acétylcholine. Les deux cœurs sont plongés dans une solution saline dite liquide de Ringer. Le nerf pneumogastrique du premier cœur donneur, est stimulé électriquement, il en résulte une diminution de la fréquence cardiaque. La solution saline est ensuite perfusée dans le cœur receveur dépourvu de nerf vague. Loewi observe ainsi une diminution du rythme cardiaque. Ces résultats lui permirent de poser l'hypothèse de l'existence d'une substance qu'il nomma « vagusstoff » (en « allemand matériel vague ») (**Figure I-2**).

Cependant, ce n'est qu'à partir des années 1950, que les travaux de Sir John Carew Eccles (prix Nobel de médecine de physiologie ou de médecine en 1963) sur les jonctions neuromusculaires permirent de valider la piste de la nature chimique de la transmission synaptique (**Figure I-3**).



Figure I-3 : Sir John Carew Eccles

« Le cerveau est une machine qu'un fantôme peut faire marcher »

Depuis les années trente, la distribution ubiquitaire du glutamate dans les tissus cérébraux a été validée et de nombreuses fonctions lui ont été attribuées.¹ Notamment en 1935, où son rôle dans le métabolisme a été validé puisque le glutamate provient de l' α -cétoglutarate produit pendant le cycle de Krebs.² Ce n'est que vingt ans plus tard qu'un scientifique japonais, Hayashi, observa un effet convulsivant suite à l'injection de glutamate dans le cerveau. Il faudra attendre les travaux de Curtis, Phillis et Watkins au sein de l'équipe de Sir John Carew Eccles pour montrer que le L-glutamate possède un effet excitateur sur la moelle épinière.³ Cependant, le glutamate en tant que neurotransmetteur excitateur ne sera caractérisé comme tel qu'à partir des années quatre-vingts et les travaux de Usherwood et de Fonnum.⁴

I.2 Un acide aminé non-essentiel

Les vingt-deux acides aminés naturels de configuration L sont classés en deux groupes : les acides aminés essentiels et les acides aminés non essentiels. Appartenant à cette dernière classe et n'ayant pas la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE), l'acide L-glutamique ne peut être apporté par l'alimentation. Cet acide aminé non-essentiel est donc synthétisé *de novo* dans le cerveau, où il est le principal acide aminé libre, à partir du glucose selon deux grandes voies.^{5, 6}

-
1. Watkins, J. C., *et al. Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, S100-S108.
 2. Krebs, H. A. *Biochem. J.* **1935**, 29, 1951-1969.
 3. Curtis, D. R., *et al. J. Neurochem.* **1960**, 6, 117-41.
 4. Fonnum, F. J. *Neurochem.* **1984**, 42, 1-11.
 5. Hawkins, R. A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, 90, 867s-874s.
 6. Takahashi, T., *et al. Open Nutraceuticals J.* **2011**, 4, 205-2012.

Le glutamate est synthétisé *de novo* par la transamination de l' α -cétoglutarate produit lors du cycle des acides tricarboxylique, ou cycle de Krebs, qui a lieu dans les astrocytes produisant l' α -cétoglutarate (**Schéma I-1**). Ce dernier est ensuite transféré dans les neurones pour y être transformé en glutamate par la glutamate déshydrogénase (GDH). Cette réaction mitochondriale utilise des cofacteurs à nicotinamide adénine dinucléotide (**Schéma I-2**).^{7, 8}

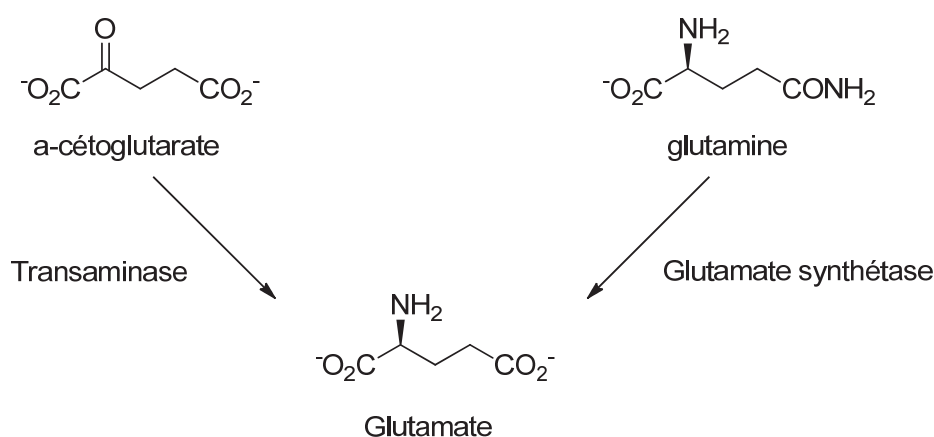


Schéma I-1 : Voies de biosynthèse du glutamate

Le glutamate peut aussi être produit à partir de la glutamine. Cette voie de synthèse est connue sous le nom de « cycle glutamate-glutamine » entre les neurones et les cellules gliales et fait intervenir une enzyme la glutaminase (PAG : phosphate-activated glutaminase).⁹

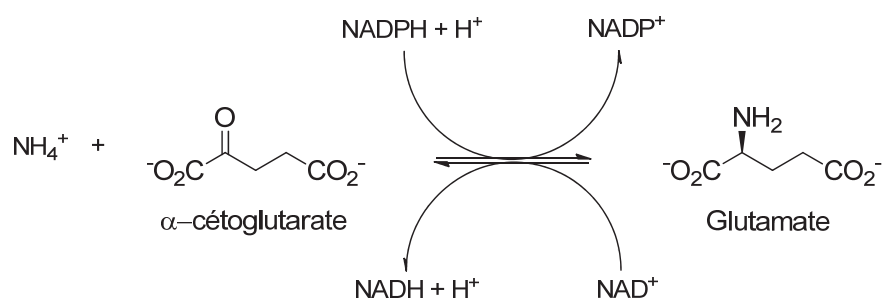


Schéma I-2 : Formation de glutamate par la glutamate déshydrogénase

7. Danbolt, N. C. *Prog. Neurobiol.* **2001**, 65, 1-105.
8. Hertz, L., et al. *Trends Neurosci.* **2004**, 27, 735-743.
9. Tapiero, H., et al. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, 446-457.

I.3 Neurotransmetteur excitateur majoritaire du système nerveux central

Le glutamate a été montré comme étant un précurseur de l'acide γ-aminobutyrique par Roberts et Frankel.¹⁰ Cependant, il faudra attendre trente-quatre ans avant que Fonnum attribue le qualificatif de neurotransmetteur au glutamate.⁴

La concentration cérébrale en glutamate est de l'ordre de 5 à 15 mmol/kg, dont la majorité est localisée dans les neurones.¹¹ Au niveau du système nerveux central, le glutamate est impliqué dans la majorité des transmissions synaptiques excitatrices des vertébrés.¹² Dans le cerveau humain, il est d'ailleurs estimé que plus de la moitié des 10¹⁴ synapses sont des synapses glutamatergiques.

I.4 Neurotoxicité du glutamate

Cet acide aminé possède un rôle physiologique essentiel. Il n'est alors pas surprenant qu'il soit impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques normaux et pathologiques. Son implication dans la plasticité synaptique, à l'origine des phénomènes de mémoire et d'apprentissage, a largement été décrite.^{9, 13-17}

Lucas et Newhouse sont les premiers à avoir décrit que l'injection de glutamate directement dans des rétines de souris provoquait une destruction des neurones des couches internes de la rétine.¹⁸

En 1969, Olney qualifia le glutamate d'excitotoxique.¹⁹ En effet, il peut être une neurotoxine potentielle et son excitotoxicité est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives comme les accidents vasculaires cérébraux, la sclérose latérale amyotrophique et l'épilepsie.²⁰

Cette excitotoxicité a fait l'objet de nombreuses hypothèses notamment sur son implication dans la mort neuronale via la sur-stimulation des récepteurs aux acides aminés excitateurs. Celles-ci ont pu être validées par l'injection de fortes doses de glutamate dans des zones cérébrales non protégées par la BHE qui ont conduit à une mort neuronale.^{21, 22} Un corollaire a pu être établi lors du choc ischémique. Le cerveau étant privé d'oxygène, il en résulte une dépolarisation excessive des neurones qui conduit à une forte libération de glutamate. Cette concentration extracellulaire excessive implique un influx d'ions calcium important. Ce mécanisme active des enzymes cataboliques qui vont induire une mort neuronale.²³⁻²⁵ De nombreuses

10. Roberts, E., *et al.* *J. Biol. Chem.* **1950**, 187, 55-63.
11. Featherstone, D. E. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 4-12.
12. Recasens, M., *et al.* *Curr. Drug Targets.* **2007**, 8, 651-81.
13. Attwell, D. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1023S-5S.
14. Meldrum, B. S. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1007S-15S.
15. Tzschentke, T. M. *Amino Acids.* **2002**, 23, 147-52.
16. Foster, A. C., *et al.* *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 7-17.
17. Muir, K. W. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 53-60.
18. Lucas, D. R., *et al.* *AMA Archiv. Ophthalmol.* **1957**, 58, 193-201.
19. Olney, J. W. *Science.* **1969**, 164, 719-21.
20. Smith, Q. R. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1016s-1022s.
21. Kirino, T. *Rinsho Shinkeigaku.* **1989**, 29, 1522-5.
22. Albin, R. L., *et al.* *Neurology.* **1992**, 42, 733-738.
23. Benveniste, H., *et al.* *J. Neurochem.* **1984**, 43, 1369-74.
24. Orrenius, S., *et al.* *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 552-65.
25. Szydlowska, K., *et al.* *Cell Calcium.* **2010**, 47, 122-129.

études sur cellules sont réalisées afin de déterminer les mécanismes de cette toxicité.^{26, 27} Depuis, l'excitotoxicité est considérée comme étant le mécanisme prédominant de mort cellulaire due à un traumatisme du SNC, une crise d'épilepsie ou une pathologie neurodégénérative.²⁸

Actuellement, de nombreuses études sont menées sur la découverte et le développement de molécules neuroprotectrices.²⁹⁻³² Les différentes pistes, principalement étudiées, sont élaborées sur des composés capables de moduler l'action des acides aminés excitateurs sur leurs récepteurs. Ce blocage peut être envisagé en développant des inhibiteurs de la libération de glutamate ou encore en stimulant la recapture de celui-ci depuis la fente synaptique.

-
26. Choi, D. W., *et al. J. Neurosci.* **1987**, 7, 357-368.
 27. Ha, J. S., *et al. Brain Res.* **2009**, 1273, 138-143.
 28. Rajendra, W., *et al. Brain Res. Rev.* **2004**, 45, 125-41.
 29. al Qatari, M., *et al. Alcohol Clin. Exp. Res.* **2001**, 25, 1276-1283.
 30. Bosel, J., *et al. J. Neurochem.* **2005**, 92, 1386-98.
 31. Fang, J. H., *et al. BMC Neurosci.* **2010**, 11, 31.
 32. Zhang, Q., *et al. Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, 252, 62-72.

II. Le système glutamatergique

II. Le système glutamatergique

II.1 Le cycle du glutamate

Le glutamate est stocké dans des vésicules au niveau de l'élément pré-synaptique des synapses glutamatergiques où sa concentration peut dépasser les 100mM.¹¹ Sous l'influx d'un potentiel d'action, les vésicules migrent et fusionnent avec la membrane pré-synaptique (**Figure II-1**).^{33, 34}



Figure II-1 : Schéma simplifié d'une synapse glutamatergique d'après Sanacora et al.³⁴

33. Walton, H. S., et al. *Neurochem. Int.* **2007**, 50, 1052-1066.

34. Sanacora, G., et al. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 426-37.

Ainsi le glutamate se retrouve libéré dans la fente synaptique. Là, il va pouvoir interagir avec deux types de récepteurs pré et post-synaptiques :

- les récepteurs ionotropiques (iGluR) en charge de la transmission synaptique rapide,
- les récepteurs métabotropiques (mGluRs) qui jouent le rôle de modulateur.

Le glutamate, après diffusion dans la fente synaptique, est recapturé dans les cellules gliales *via* des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAATs pour excitatory amino-acid transporters), puis converti en glutamine par la glutamine synthétase. La glutamine est ensuite prise en charge par des transporteurs spécifiques pour la réintroduire dans le neurone pré-synaptique, hydrolysée par la glutamate synthétase et ainsi recyclée en glutamate.¹⁶ Le glutamate est réintroduit dans les vésicules de stockage *via* les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) dans l'attente d'un nouveau potentiel d'action. Ces transporteurs étant au cœur de ce travail de thèse, un paragraphe leur est dédié (**Paragraphe III**).

II.2 Des récepteurs ionotropiques aux récepteurs métabotropiques

II.2.a Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont les premiers récepteurs du glutamate à avoir été identifiés. Ces récepteurs sont nommés en fonction de leurs agonistes sélectifs : les récepteurs NMDA (*N*-méthyl-D-aspartate), AMPA (acide (*S*)- α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique) et kaïnate (KA) (**Figure II-2**).^{1, 35} Les récepteurs AMPA et kaïnate sont souvent regroupés sous l'appellation de récepteurs « non-NMDA ».

Les iGluRs sont des récepteurs canaux qui permettent l'entrée de cations, principalement de Na⁺. Cet afflux d'ions provoque une dépolarisation du neurone post-synaptique.

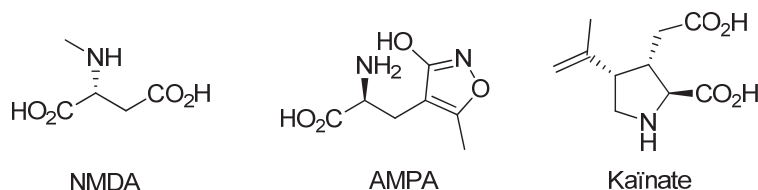


Figure II-2 : Agonistes éponymes des récepteurs iGluRs

Ce sont les récepteurs AMPA qui sont responsables de la majorité des transmissions synaptiques. Les récepteurs non-NMDA (AMPA et kaïnate) sont caractérisés par une faible affinité pour le glutamate et une cinétique rapide, alors que les récepteurs NMDA présentent une affinité vis-à-vis du glutamate plus élevée ($EC_{50} \approx 1 \mu M$) et une cinétique d'activation plus lente notamment due aux ions Mg²⁺ qui bloquent les récepteurs.³⁶ Par ailleurs, les récepteurs NMDA sont très perméables aux ions Ca²⁺. Les iGluRs sont impliqués dans la transmission synaptique rapide et sont généralement situés sur la membrane post-

35. Mayer, M. L., *et al. Annual Rev. Physiol.* **2004**, 66, 161-81.

synaptique à proximité du site de libération du glutamate.³⁷ Il existe néanmoins des iGluRs pré-synaptiques qui régulent la neurotransmission.³⁷

➤ Structure des iGluRs

Les données sur la structure des récepteurs ionotropiques ont connu une avancée importante en 1989 avec les travaux de clonage réalisés par Hollman *et al.*³⁸ Les iGluRs sont des récepteurs transmembranaires assemblés en tétramères possédant un important domaine extracellulaire (**Figure II-3**).^{14,15}

ATD : domaine amino-terminal, D1 et D2 : domaine de liaison de l'agoniste, M1-3 et P :
domaine transmembranaire

Figure II-3 : Structure d'un iGluR d'après Mayer *et al.*³⁹

Cependant, sous l'action prolongée d'un agoniste, les récepteurs iGluRs passent dans un état dit désensibilisé. Ce mécanisme est dit de neuroprotection car il permet d'éviter une dépolarisation trop importante conduisant à la destruction des cellules nerveuses.

-
36. Dingledine, R., *et al. Pharmacol. Rev.* **1999**, 51, 7-61.
37. Pinheiro, P. S., *et al. Nature Rev. Neurosci.* **2008**, 9, 423-36.
38. Hollmann, M., *et al. Nature.* **1989**, 342, 643-8.
39. Mayer, M. L. *Nature.* **2006**, 440, 456-62.

II.2.b Les récepteurs métabotropiques

Dans la moitié des années 1980, il apparaît que le glutamate n'active pas uniquement des récepteurs canaux mais également des récepteurs couplés aux protéines G.⁴⁰ Ces nouveaux récepteurs sont appelés récepteurs métabotropiques (mGluR). Huit récepteurs de la famille des mGluRs ont été identifiés, nommés mGluR1-8 et classés en trois groupes en fonction de leurs actions sur la transduction du signal. Les récepteurs du groupe I (mGlu₁ et mGlu₅) sont couplés à la protéine G_q et activent la phospholipase C alors que les récepteurs du groupe II (mGlu₂ et mGlu₃) et III (mGlu₄, mGlu₆, mGlu₇ et mGlu₈) sont couplés à la protéine G_i et inhibent l'adénylate cyclase (**Figure II-4**).

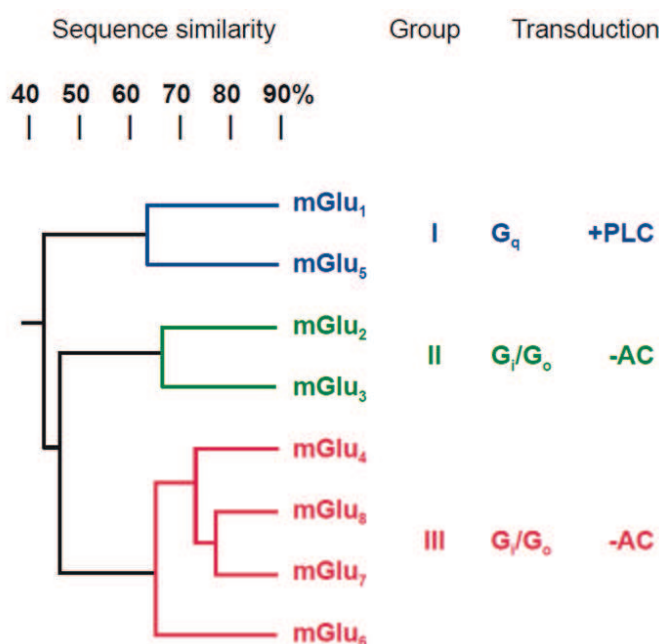


Figure II-4 : Classification des mGluRs selon leur identité de séquence

II.2.b.i Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)

Les récepteurs couplés aux protéines G représentent la famille de récepteurs transmembranaires qui a subi la plus grande diversification au cours de l'évolution.^{41, 42} Ces récepteurs sont responsables de la communication intercellulaire et peuvent reconnaître de nombreux messagers comme des ions, des acides aminés, des photons ou même des protéines (**Figure II-5**). Malgré leur diversité, les RCPGs présentent des caractéristiques communes.⁴³ Les RCPGs possèdent sept domaines transmembranaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Ces domaines transmembranaires sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (e1-e3) et trois boucles intracellulaires (i1-i3). L'activation

40. Pin, J. P., et al. *Neuropharmacology*. **1995**, 34, 1-26.

41. Bockaert, J., et al. *EMBO J.* **1999**, 18, 1723-1729.

42. Bockaert, J., et al. *C. R. Acad. Sci. III.* **1998**, 321, 529-51.

43. Bridges, T. M., et al. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 530-41.

des récepteurs couplés aux protéines G par un stimulus extracellulaire induit des changements conformationnels permettant l'activation de la protéine G associée et l'interaction avec des effecteurs responsables de messagers intracellulaires.

Figure II-5 : Structure générale des RCPG d'après Bockaert et al.⁴¹

II.2.b.ii Structure des mGluRs

Le domaine le plus conservé parmi les mGluRs est un domaine hydrophobe extracellulaire, identifié comme le domaine de liaison de l'agoniste. Ce domaine est appelé VFT pour Venus Flytrap par analogie au mécanisme de fonctionnement de la plante carnivore Venus de Dionée. Ce domaine VFT est connecté aux domaines transmembranaires par l'intermédiaire d'un domaine riche en cystéine (une centaine de résidus), dont le rôle exact est encore méconnu.⁴⁴ Les mGluRs possèdent sept hélices transmembranaires reliées entre elles par des boucles intra et extracellulaires.

II.2.b.iii Localisation des mGluRs

Les mGluRs sont des modulateurs de la transmission synaptique et jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie.⁴⁵ De ce fait, leur localisation est beaucoup plus large que celle des iGluRs. Les mGluRs sont répartis dans diverses régions des neurones ainsi que des cellules gliales.⁴⁶ Certains récepteurs sont également présents en dehors du système nerveux central.⁴⁷

Notre axe de travail étant la neurotransmission, nous ne nous intéresserons ici qu'aux localisations intra SNC. La majorité des récepteurs du groupe I est post-synaptique et elle augmente l'excitabilité synaptique

44. Rondard, P., et al. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 24653-61.

45. Kuzmiski, J. B., et al. *J. Neuroendocrinol.* **2010**, 22, 785-92.

46. Ferraguti, F., et al. *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, 483-504.

47. Nicoletti, F., et al. *Psychoneuroendocrinology*. **2007**, 32 Suppl 1, S40-5.

en interagissant avec les iGluRs ou les canaux ioniques. Les récepteurs du groupe II et III sont principalement pré-synaptiques et inhibent la neurotransmission, par exemple par interaction avec des canaux ioniques. Les récepteurs du groupe III sont situés à proximité de la fente synaptique alors que les récepteurs du groupe II en sont plus éloignés.

La large distribution et le rôle de modulateur des récepteurs métabotropiques du glutamate constituent des cibles thérapeutiques de choix. Outre la régulation du glutamate, les mGluRs sont impliqués dans de nombreuses pathologies du SNC comme la schizophrénie, l'épilepsie, l'anxiété et le stress ou la maladie de Parkinson.^{48, 49} Au sein de notre laboratoire, riche d'une grande expérience sur le glutamate et ses récepteurs, des études sont poursuivies sur le développement et la synthèse d'agonistes orthostériques de mGlu4R à visée antiparkinsonien.⁵⁰

II.3 Les transporteurs d'acides aminés excitateurs

II.3.a Généralités et cycle des EAATs

A l'origine, ces transporteurs étaient connus sous le nom de « transporteurs de haute affinité dépendant du sodium » (sodium-dependent high-affinity transporters) afin de pouvoir les distinguer des transporteurs de faible affinité. Cependant, depuis que leur affinité a été caractérisée, entre 1 et 100 μM dépendant du sous type de transporteur, et à cause de la force motrice due à un gradient de sodium et de calcium, ces transporteurs portent le nom de « transporteurs du glutamate couplés au sodium et au potassium » (sodium and potassium coupled glutamate transporters). L'appellation de ces transporteurs est « EAAT » pour transporteurs d'acides aminés excitateurs (excitatory amino acids transporters). Cet acronyme est dû au fait que les EAATs sont aussi capables de prendre en charge le L-aspartate (L-Asp) et le D-Aspartate (D-Asp) en plus du transport du glutamate.

Les EAATs sont des membres de la famille des SLC 1 pour « Solute carrier » (transporteurs de solutés), famille qui inclut aussi les transporteurs d'acides aminés neutres sodium-dépendant ASCT1 et ASCT2 (**Figure II-6**).⁵¹ Ils ont pour but de réguler la concentration de glutamate dans la fente synaptique ainsi de prévenir l'intégrité de la synapse vis-à-vis de l'excitotoxicité de ce dernier.

Le passage du glutamate à travers la membrane cellulaire est un processus énergétiquement défavorable qui a lieu contre un gradient de concentration important. Ainsi, les EAATs sont des symports.

Le terme de symport fait référence à un transporteur capable de déplacer un substrat *via* la mobilisation d'ions colocalisés et de contre-ions.

48. Wright, R. A., *et al. Neuropharmacology*. **2012**.

49. Duty, S. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 161, 271-87.

50. Amalric, M., *et al. Neuropharmacology*. **2012**, in press.

51. Kanai, Y., *et al. Pflügers Archiv*. **2004**, 447, 469-79.

Figure II-6 : Mécanisme de transport du glutamate par les EAATs d'après Bridges *et al.* ⁵²

Les modèles actuels indiquent que les EAATs opèrent *via* un mécanisme alternatif par lequel l'initiation du cycle des EAATs est permise par l'action simultanée de la liaison du substrat, de trois ions sodium et d'un proton sur la conformation « ouverte » de la protéine. Ce processus déclenche un changement conformationnel correspondant à la fermeture du pore. Ainsi, les molécules transportées sont relarguées dans le cytoplasme de la cellule gliale. Le transporteur retourne dans sa conformation ouverte sur la fente synaptique *via* la liaison d'un contre-ion potassium et redevient alors accessible à un nouveau substrat (**Figure II-6**).^{7, 51, 53, 54} Cependant, certains EAATs, principalement 4 et 5, ont la capacité de faire un double transport glutamate/chlorure. Ils combinent une relativement faible capacité de recapture du glutamate depuis la fente synaptique avec une importante conductivité de chlore.

La force motrice générée par le gradient de sodium et de potassium permet de maintenir une concentration intracellulaire en glutamate 10^5 fois supérieure à la concentration extracellulaire.⁵³

II.3.b Les différents sous-types d'EAATs

Actuellement, la famille des EAATs est composée de cinq sous-types de transporteurs du glutamate nommés EAAT1 à EAAT5.

Les trois premiers transporteurs du glutamate sodium-dépendant à haute affinité ont été clonés et exprimés presque simultanément en 1992 : GLAST (glutamate/aspartate transporter), GLT-1 (glutamate transporter-1) à partir de cerveau de rats et EAAC1 (excitatory amino acid carrier 1) à partir d'intestin de lapins.⁵⁵⁻⁵⁷ Deux ans plus tard chez l'homme, ces protéines ont été isolées et appelées respectivement

52. Bridges, R. J., *et al. Pharmacol. Ther.* **2005**, 107, 271-85.

53. Zerangue, N., *et al. Nature.* **1996**, 383, 634-7.

54. Shigeri, Y., *et al. Brain Res. Rev.* **2004**, 45, 250-265.

55. Storck, T., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**, 89, 10955-9.

56. Pines, G., *et al. Nature.* **1992**, 360, 464-7.

57. Kanai, Y., *et al. Nature.* **1992**, 360, 467-71.

EAAT1, EAAT2 et EAAT3.⁵⁸ Depuis, des banques de données d'ADNc humain ont été criblées et ont permis d'isoler dans le cervelet le quatrième membre de cette famille EAAT4 ainsi que l'EAAT5 dans la rétine.⁵⁹ La comparaison des séquences de ces cinq transporteurs a montré qu'il existe entre 50 et 60 % d'homologie entre les différents sous types.^{59, 60}

En 2004, Yernool *et al.* ont réussi à cristalliser un orthologue du transporteur de glutamate chez le *Pyrococcus horikoshii*.⁶¹ Cependant les informations, pouvant être extrapolées de cette cristallographie, sont relatives puisque le transporteur présente seulement 37% d'homologie de séquence avec l'EAAT2 humain.

II.3.c Distribution et fonctions physiologique des EAATs

Les quatre premiers sous-types EAAT1-EAAT4 sont principalement répartis dans le système nerveux central au niveau des synapses. Le cinquième sous-type (EAAT5) est, quant à lui, retrouvé exclusivement au niveau des bâtonnets et des cellules bipolaires de la rétine (**Tableau II-1**).⁶⁰

EAAT1/GLAST est principalement exprimé dans les astrocytes et notamment dans le cervelet, c'est le sous-type majoritaire lors du développement du système nerveux central. Pourtant à terme, ce transporteur est exprimé de façon bien inférieure aux EAAT2.^{55, 62, 63}

Le transporteur de type 2 est responsable de plus de 90% de la recapture du glutamate total.⁶²⁻⁶⁴ Il est d'ailleurs considéré comme étant le transporteur des cellules gliales. Les EAAT2 sont exprimés dans les neurones et les oligodendrocytes au niveau du cerveau et de la moelle épinière.^{65, 66} Il existe 2 isoformes de ce transporteur. Les EAAT2b diffèrent des EAAT2 par leurs séquences en acides aminés au niveau des extrémités N- et C-terminales. Leurs localisations cérébrale et cellulaire diffèrent. Il a été envisagé que ces deux isoformes proviennent d'une différence de régulation post-transcriptionnelle.⁶⁵

Bien que les EAAT3/EAAC-1 et EAAT4 aient été retrouvés dans des astrocytes, ces deux sous-types sont considérés comme étant des transporteurs neuronaux et sont principalement post-synaptiques.^{59, 67} Le sous-type 3 est exprimé en forte concentration dans le cerveau et principalement dans le cortex, l'hippocampe, les ganglions de la base et le cervelet. Une particularité intéressante réside dans le fait qu'environ 20% des EAAT3 sont exprimés à la surface cellulaire. Les 80% restants sont localisés dans le cytosol et peuvent être rapidement mobilisés pour activer l'expression sur la membrane cellulaire.⁶⁸

Les EAAT4 sont quant à eux exclusivement localisés dans les corps cellulaires et les dendrites des cellules GABAergiques de Purkinje. Cependant, de faibles niveaux d'expression ont pu être relevés au niveau de l'hippocampe et du néocortex.^{59, 63, 67, 69}

-
58. Arriza, J. L., *et al. J. Neurosci.* **1994**, 14, 5559-69.
 59. Fairman, W. A., *et al. Nature.* **1995**, 375, 599-603.
 60. Arriza, J. L., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**, 94, 4155-60.
 61. Yernool, D., *et al. Nature.* **2004**, 431, 811-8.
 62. Maragakis, N. J., *et al. Neurobiol. Dis.* **2004**, 15, 461-73.
 63. Bar-Peled, O., *et al. J. Neurochem.* **1997**, 69, 2571-80.
 64. Furuta, A., *et al. J. Neurosci.* **1997**, 17, 8363-75.
 65. Lauriat, T. L., *et al. Mol. Psychiatry.* **2007**, 12, 1065-78.
 66. Sheldon, A. L., *et al. Neurochem. Int.* **2007**, 51, 333-355.
 67. Furuta, A., *et al. Neuroscience.* **1997**, 81, 1031-42.
 68. Nieoullon, A., *et al. J. Neurochem.* **2006**, 98, 1007-18.
 69. Massie, A., *et al. J. Comp. Neurol.* **2008**, 511, 155-72.

Les EAAT5 sont localisés au niveau de la rétine dans les cônes (vision diurne) et les bâtonnets (vision nocturne).⁶⁰

Tableau II-1 : Caractéristiques principales des EAATs humains d'après Kim *et al.*⁷⁰

| Sous-type de transporteur | Localisation dans le SNC | Expression cellulaire | Propriétés |
|---------------------------|---|--|--|
| EAAT1 | Importante dans le cervelet Déte  t   dans le cortex et la moelle épinière | Astrocytes | Principal sous-type exprimé lors du développement du SNC |
| EAAT2 | Cerveau et moelle épinière | Principalement dans les astrocytes Neurones oligodendrocytes | Responsable de plus de 90% de la recapture du glutamate total |
| EAAT3 | Cerveau Principalement dans le cortex, l'hippocampe, les ganglions de la base et le cervelet | Terminaison post-synaptique D  te  t   dans les astrocytes | Expression membranaire régulée par le cholestérol et les kinases intracellulaires |
| EAAT4 | Corps cellulaire et dendrites des cellules de Purkinje, d  te  t   dans l'hippocampe, le néocortex | Terminaison post-synaptique D  te  t   dans les astrocytes | Forte conductance du Cl ⁻ |
| EAAT5 | Rétine | Cônes Bâtonnets | Forte conductance du Cl ⁻ |

II.3.d Ligands des EAATs

De par leur activité sur la recapture du glutamate et la neurotoxicité de celui-ci, de nombreuses études ont été réalisées afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces transporteurs et leurs interactions.

La présentation de certains ligands des EAATs ne se veut pas exhaustive, elle a pour but d'avoir une vue d'ensemble des principales découvertes dans les dernières décennies.

II.3.d.i Inhibiteurs des EAATs

Les premiers inhibiteurs des EAATs identifiés sont des acides ka  nique (KA) et dihydroka  nique (DHK), acides que l'on retrouve dans certaines algues. Ces molécules sont des analogues structuraux du glutamate qui possèdent une forte sélectivité vis-à-vis des EAATs de sous-type 2.⁷¹ Le DHK est le premier inhibiteur sélectif décrit des EAAT2.⁷²

70. Kim, K., *et al. J. Cell. Physiol.* **2011**, 226, 2484-93.

71. Vandenberg, R. J., *et al. Mol. Pharmacol.* **1997**, 51, 809-15.

72. Bunch, L., *et al. Med. Res. Rev.* **2009**, 29, 3-28.

Un des premiers inhibiteurs, n'ayant pas une structure mimant celle du glutamate, est le DL-TBOA (Acide DL-*thréo*- β -benzyloxyaspartique) (**Figure II-7**). Cette molécule est un dérivé substitué en position 3 de l'aspartate. Des études de relation structure-activité ont montré l'importance des substituants portés en position 3.⁷³ Ainsi, le TFB-TBOA s'est révélé être un des meilleurs inhibiteurs connus à ce jour (**Figure II-7**).⁷⁴ Cependant, aucune de ces deux molécules ne possède de sélectivité vis-à-vis des EAAT1 ou EAAT3. Le I- β -BA, analogue du DL-TBOA tronqué d'un oxygène en position 3, présente quant à lui une sélectivité dix fois supérieure pour les EAAT3 par rapport aux sous-types 1 et 2. Il est alors un bon candidat pour le développement d'inhibiteurs sélectifs du sous-type 3 (**Figure II-7**).⁷⁵

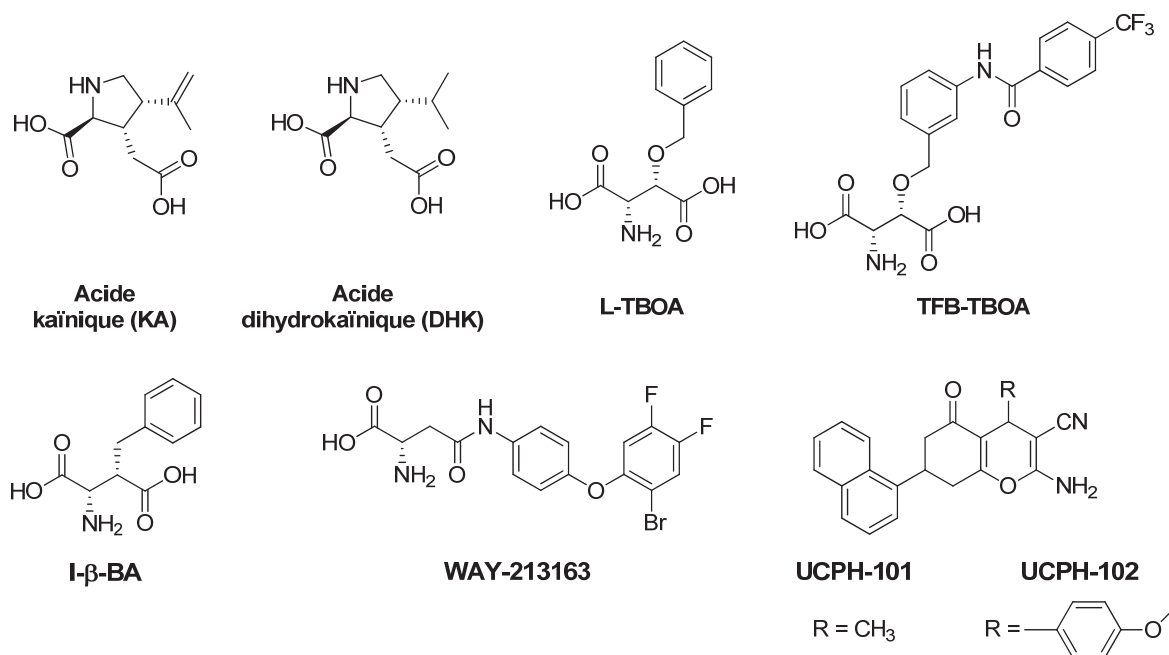


Figure II-7 : Structures chimiques de certains inhibiteurs des EAATs

En 2005, il a été montré que le composé WAY-213613 possédait une forte sélectivité pour les EAAT2, cinquante fois supérieure à celle des sous-types 1 et 3.⁷⁶

La première molécule décrite comme étant sélective du premier sous-type des transporteurs du glutamate appartient à la série 2-amino-4,7-diaryl-5-oxo-tetrahydro-4*H*-chromene-3-carbonitrile et est connue sous le nom d'UCPH-101 (**Figure II-7**). Cette molécule polyaromatique possède une activité de l'ordre de 0,660 μ M et une sélectivité quatre cents fois plus importante pour les EAAT1 par rapport aux 2 et 3.^{77, 78} A partir de la découverte de cette molécule, une centaine de molécules a été synthétisée permettant, dans un premier temps, de mener une étude de relation structure-activité mais aussi de découvrir un

73. Shimamoto, K., *et al. Mol. Pharmacol.* **1998**, 53, 195-201.

74. Shimamoto, K., *et al. Mol. Pharmacol.* **2004**, 65, 1008-1015.

75. Esslinger, C. S., *et al. Neuropharmacology.* **2005**, 49, 850-61.

76. Dunlop, J., *et al. Mol. Pharmacol.* **2005**, 68, 974-82.

77. Jensen, A. A., *et al. J. Med. Chem.* **2009**, 52, 912-5.

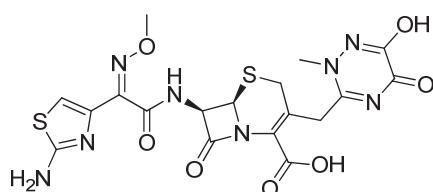
78. Erichsen, M. N., *et al. J. Med. Chem.* **2010**, 53, 7180-91.

nouveau composé nommé UCPH-102 (**Figure II-7**) Cette molécule possède les mêmes caractéristiques que l'UCPH-101 vis-à-vis des sous-types 2 et 3, mais possède une activité de 0,43 μM sur les EAAT1.⁷⁹ De plus, il possède l'avantage de traverser la barrière hémato-encéphalique. Ces deux composés font l'objet d'un brevet portant le numéro WO/2010/066253. Une société de biotechnologie (Hugin Neurochemicals) a été créée par Jensen et Bunch en 2009 et commercialise ces deux molécules (www.huginneurochemicals.com). Les composés, qui se sont révélés avoir une activité inhibitrice sur les transporteurs du glutamate, sont des molécules dérivées d'acides aminés naturels. De ce fait, il serait pertinent de s'intéresser à des bases de données de molécules ayant des structures proches du glutamate ou de l'aspartate. Ces bases pourraient être alors criblées afin de trouver de nouveaux synthons sélectifs des différents sous-types des EAATs (**Figure II-7**).

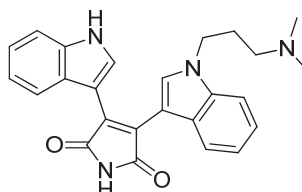
II.3.d.ii Activateurs des EAATs

Les activateurs des EAATs ont principalement deux modes d'action sur l'augmentation du transport du glutamate : soit ils activent des modifications transcriptionnelles et/ou post-transcriptionnelles, soit ils interagissent directement avec les transporteurs.

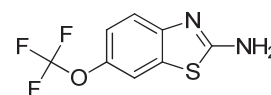
Les antibiotiques de type β -lactames peuvent être cités comme exemple de modulateurs de l'expression génique, notamment le Ceftriaxone qui va augmenter sélectivement l'expression du gène EAAT2/GLT-1 via l'activation du promoteur de GLT-1 (**Figure II-8**).⁸⁰



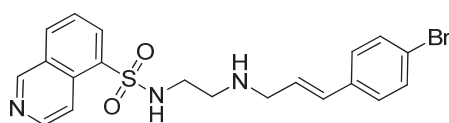
Ceftriaxone



GF 109203X



Riluzole



H89

Parawaxin1

Structure non élucidé à ce jour

Figure II-8 : Structures chimiques de certains activateurs des EAATs

Adolph *et al.* ont montré que les composés GF 109203X et H89 possèdent la capacité d'augmenter le recapture astrocytaire du glutamate en bloquant la protéine kinase A (PKA). Ceci induit donc un changement dans la voie de signalisation qui va provoquer l'augmentation de l'expression du transporteur de type 1.⁸¹

79. Huynh, T. H., *et al.* *Ibid.* **2012**, 55, 5403-12.
 80. Rothstein, J. D., *et al.* *Nature*. **2005**, 433, 73-7.
 81. Adolph, O., *et al.* *Glia*. **2007**, 55, 1699-1707.

De nombreux composés, connus pour leurs propriétés anesthésiques, tels que les carbamazépines, la lidocaïne, l'isoflurane ou l'alphaxalone ont été décrits comme des potentiateurs de l'activité des EAAT3 en modulant l'activité de la protéine kinase C (PKC) et/ou de la phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K).⁸²⁻⁸⁶

Seuls quelques composés ont été identifiés comme agissant directement sur les transporteurs. Le Riluloze, un médicament utilisé dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique, est connu pour modifier l'affinité du glutamate vis-à-vis du transporteur et ainsi augmenter sa recapture. En revanche, aucune sélectivité pour les sous-types d'EAAT1-3 n'a pu être observée, contrairement à la Parawixin 1 qui augmente exclusivement la recapture du glutamate par les EAAT2.⁸⁷ Cette toxine d'araignée catalyse un changement conformationnel du transporteur qui va accélérer le turnover de la protéine lors du cycle du transport du glutamate. Ce composé serait une molécule de choix pour le développement de modulateurs allostériques des EAATs, cependant la structure de ce composé reste encore méconnue et aucun résultat n'a été publié depuis 2007.

II.3.e Les EAATs comme nouvelle cible thérapeutique

Le potentiel des EAATs, comme cible de médicament, est intrinsèquement lié à leur distribution quasi ubiquitaire et leurs fonctions physiologiques sont différentes. De par la neurotoxicité du glutamate et la capacité de recapture de celui-ci par ces transporteurs, de nombreuses études sont menées pour développer des médicaments contre les maladies neurodégénératives et les pathologies neurotoxiques mais aussi en prévention de neuropathologies.

Grewer *et al.* en 2008 ont montré que lors d'une ischémie cérébrale où les conditions d'oxygène et d'énergie sont réduites, les EAATs ont la capacité de faciliter l'efflux du glutamate de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule et ainsi relarguer le neurotransmetteur dans la fente synaptique.⁸⁸ Contrairement aux maladies neurodégénératives qui ont été décrites comme résultantes d'une hyperactivité du système glutamatergique, il semblerait que les pathologies psychiatriques soient dues à une baisse de cette activité. Ainsi des inhibiteurs de ce transport seraient des candidats médicaments à fort intérêt thérapeutique, même s'il ne faut pas perdre de vue le risque d'excitotoxicité au niveau de la fente synaptique.

82. Do, S. H., *et al. Anesth. Analg.* **2002**, 95, 1263-1268.

83. Do, S. H., *et al. Neurosci. Lett.* **2003**, 343, 113-116.

84. Lee, G., *et al. Epilepsy Res.* **2005**, 66, 145-53.

85. Yun, J. Y., *et al. Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 565, 83-8.

86. Ryu, J., *et al. Eur. J. Pharmacol.* **2009**, 602, 23-7.

87. Fumagalli, E., *et al. Eur. J. Pharmacol.* **2008**, 578, 171-6.

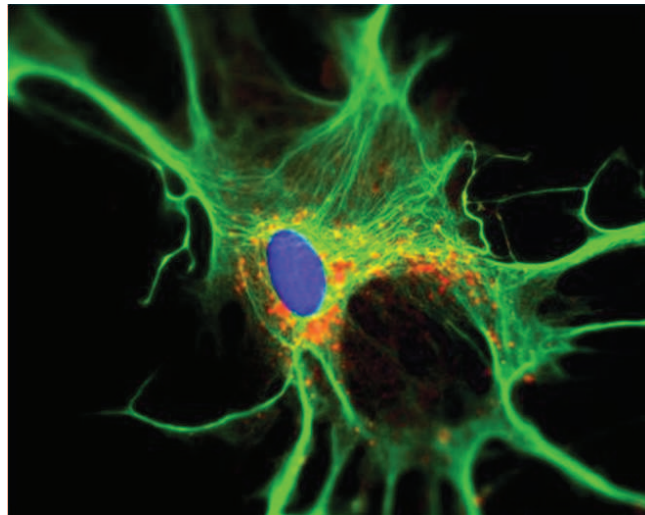
88. Grewer, C., *et al. IUBMB Life.* **2008**, 60, 609-19.

II.4 Le cycle glutamate-glutamine dans les astrocytes

II.4.a Généralités sur les astrocytes

Les cellules gliales ont été découvertes en 1839 par Théodor Shawn qui donna son nom à une cellule du système nerveux central. Au niveau du SNC, les cellules gliales existent sous trois types cellulaires :

- Les épendymocytes qui délimitent les différentes cavités du SNC,
- Les oligodendrocytes qui sont à l'origine de la myéline entourant les axones,
- Les astrocytes possédant de nombreux prolongements, le plus souvent en forme d'étoile. Cependant, il existe de nombreuses formes d'astrocytes qui sont dépendantes de leur fonction et de leur localisation. Ces cellules sont les garantes de l'intégrité du système nerveux (**Figure II-9**).



Source : www.saasta.ac.za

Figure II-9 : Culture d'astrocyte du SNC de mammifère

II.4.b Le cycle glutamate-glutamine

Les premières propositions d'un cycle glutamate-glutamine remontent aux années 1960 et étaient fondées sur l'observation de deux précurseurs radiomarqués, l'acétate et le glucose, qui conduisent à une augmentation importante de glutamate et de glutamine marqués dans le cerveau.⁸⁹

Depuis plusieurs années, la compréhension du système nerveux central a crû de façon exponentielle et il est admis que la récupération du glutamate, depuis la fente synaptique par les EAATs, permet de

89. Berl, S., et al. *J. Neurochem.* **1968**, 15, 131-140.

maintenir une concentration relativement faible (1-10 μ M). Ce rôle de récupération est une des fonction les plus importantes des astrocytes dans le cerveau.⁹⁰ Le neurotransmetteur va subir durant ce cycle des modifications structurales.

II.4.b.i La glutamine synthétase

Le glutamate qui a été intégré dans les astrocytes *via* les EAATs est pris en charge par une enzyme, la glutamine synthétase (GS : EC 6.3.1.2). C'est une enzyme ubiquitaire qui a pu être isolée dans les reins, le foie, la rate, les muscles, le cœur et dans le cerveau.^{91, 92} Elle utilise de l'ATP et de l'ammoniaque pour convertir le glutamate en glutamine, composé non neuroactif (**Figure II-10**). En condition physiologique, environ 90% du glutamate libéré dans la fente synaptique est converti en glutamine par la GS.⁹³⁻⁹⁶ Cette quantification a été possible par étude RMN de précurseurs enrichis en ¹³C et ¹⁵N chez des rongeurs ainsi que dans le cerveau humain.

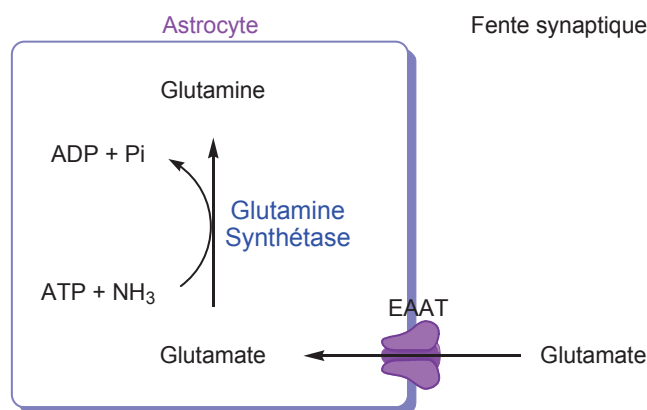


Figure II-10 : Action de la glutamine synthétase

Cette réaction, qui se réalise dans les astrocytes péri-synaptiques, joue un rôle crucial en induisant la désactivation du glutamate et en permettant la détoxification *via* l'assimilation de l'ammoniaque.

Du point de vue pharmacologique, il est possible d'intervenir de deux façons : soit en la bloquant et ainsi médier la production de glutamine dans les astrocytes, soit en inhibant la recapture du glutamate depuis la fente synaptique par les EAATs. Cependant, ces deux approches se heurtent à des limites physiologiques que sont le maintien et la régulation des processus biologiques.

90. McKenna, M. C. *J. Neurosci. Res.* **2007**, 85, 3347-58.

91. Meister, A. *Methods Enzymol.* **1985**, 113, 185-99.

92. Matthews, G. D., *et al. FEBS Lett.* **2005**, 579, 5527-34.

93. Martinezhernandez, A., *et al. Science.* **1977**, 195, 1356-1358.

94. Shen, J., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, 96, 8235-40.

95. Behar, K. L., *et al. J. Nutr.* **2001**, 131, 2498S-504S; discussion 2523S-4S.

96. Kanamori, K., *et al. J. Neurochem.* **2002**, 83, 682-95.

II.4.b.ii Les transporteurs de glutamine

La glutamine néoformée est ensuite prise en charge par des transporteurs astrocytaires.

Ces transporteurs sont classés en deux sous-familles, dépendantes ou non d'un gradient électrochimique de Na^+ . Ces transporteurs appartiennent à la grande famille des SLCs (Solute carriers = transporteurs solubles). Ces SLCs représentent un large groupe de transporteurs dans le génome humain. bvghjhtfyhtdydes neurotransmetteurs. Il a été suggéré qu'il y aurait environ 100 transporteurs SLCs pour les acides aminés dans le génome humain, pourtant soixante d'entre eux ont pu être caractérisés. Chez les mammifères, les SLCs ont été classés en quatre groupes phylogénétiques nommés α , β , γ et δ . Les transporteurs de glutamine appartiennent à la famille des SLC38 qui est constituée de 11 transporteurs.⁹⁷

➤ Transporteurs Na^+ -dépendant : Système ASC, N, $\text{B}^{\circ+}$, A et γ +L

Cette famille regroupe les transporteurs du système A dont l'implication a été suggérée dans la recapture neuronale de glutamine.^{98, 99} Le système A comporte trois isoformes SNAT1 (SLC38A1), SNAT2 (SLC38A2) et SNAT4 (SLC38A4). Les isoformes 1 et 2 sont présentes principalement au niveau du cerveau des mammifères et exprimées aussi bien sur les surfaces cellulaires des neurones glutamatergiques et GABAergiques.^{98, 100} SNAT2, quant à lui, est distribué de façon plus large puisqu'il a été caractérisé sur les membranes astrocytaires et celles des neurones.

Au niveau des astrocytes, ce sont les membres du système N qui ont été suggérés pour permettre le transport de la glutamine jusqu'à la lumière synaptique. Le système N comprend les isoformes SNAT3 (SLC38A3) et SNAT5 (SLC38A5).^{99, 101} Ces transporteurs véhiculent la glutamine et un ion sodium contre un gradient de proton. De ce fait, la capacité de transport de ces isoformes est donc dépendante du pH et de la concentration en sodium, paramètres qui sont soumis à de fortes fluctuations lors de la transmission du signal nerveux. En outre, le transport de glutamine, hors des astrocytes, peut aussi être assuré par d'autres transporteurs comme ceux appartenant au système L et ASC (substrat pour alanine, serine et cystéine).

En 2011, Hägglund *et al.* ont identifié un nouveau membre de la famille des SLC38, le SLC38A7 connu sous le nom de SNAT7.¹⁰² De par leur forte similarité, il a été proposé que SNAT7 appartienne aux transporteurs de type N. Les SLC38A7 sont exprimés dans tous les neurones mais pas dans les astrocytes (chez le rat). De plus, leur expression est connue dans le système glutamatergique et GABAergique ce qui laisse suggérer une implication dans la neurotransmission excitatrice et inhibitrice. Leur affinité pour le L-glutamate ainsi que leur localisation dans la fente synaptique indiquent que ces transporteurs doivent jouer un rôle important dans la recapture du glutamate (**Figure II-11**).¹⁰²

97. Sundberg, B. E., *et al. J. Mol. Neurosci.* **2008**, 35, 179-93.

98. Varoqui, H., *et al. J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 4049-54.

99. Chaudhry, F. A., *et al. J. Cell Biol.* **2002**, 157, 349-55.

100. Mackenzie, B., *et al. J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 23720-30.

101. Broer, A., *et al. J. Physiol.* **2002**, 539, 3-14.

102. Hägglund, M. G., *et al. J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 20500-11.

➤ Transporteurs Na^+ -indépendant : Système L et $\text{b}^{\circ,+}$

Le système L (pour transporteur préférentiel de leucine) est un antiport d'acides aminés comprenant deux isoformes, LAT1 et LAT2. Cependant, il s'est avéré que seul l'isoforme 2 possède une affinité pour la glutamine.¹⁰³

Figure II-11 : Représentation schématique de la répartition des transporteurs de Glutamine d'après Bak et al.¹⁰⁴

II.4.b.iii La glutaminase

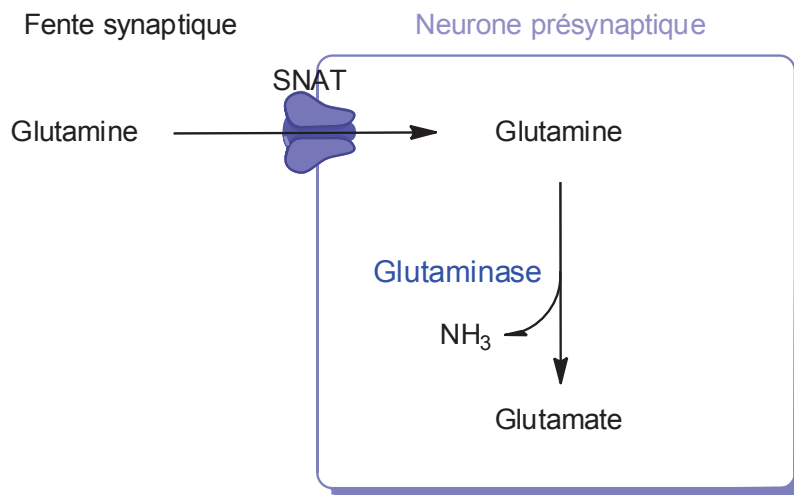


Figure II-12 : Action de la glutaminase

103. Kanai, Y., et al. Ibid. **1998**, 273, 23629-32.

104. Bak, L. K., et al. *J. Neurochem.* **2006**, 98, 641–653.

La glutamine introduite dans l'élément pré-synaptique est transformée en glutamate sous l'action d'une enzyme la glutaminase activée par phosphate (PAG : phosphate activated glutaminase).^{4, 105} Cette enzyme est la dernière étape clef du cycle glutamate-glutamine (**Figure II-12**).

II.4.b.iv Glutamate-glutamine une cible de choix pour de nouvelles thérapeutiques

Le cycle glutamate-glutamine permet de maintenir la transmission synaptique fonctionnelle et de pallier l'excitotoxicité du glutamate. Son implication dans de nombreuses pathologies du système nerveux central a largement été décrite. Différentes pathologies peuvent être citées en exemple soit comme objet actuel de recherche soit en tant que cible potentielle en thérapeutique.

La principale cause de l'ischémie cérébrale correspond à une libération astrocytaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS = reactive oxygen species).¹⁰⁶ Or, les astrocytes contiennent une grande quantité de glutathion, le principal antioxydant cérébral.¹⁰⁷ Ceci indique donc que les astrocytes sont, au niveau du SNC, les entités les plus qualifiées pour dégrader les espèces réactives de l'oxygène. Pour les astrocytes, il est alors possible d'envisager un rôle de support de la survie neuronale.^{108, 109}

L'épilepsie est une affection neurologique qui est caractérisée par une hyperactivité cérébrale et qui peut se traduire par des crises convulsives violentes. Ces convulsions sont notamment induites par une libération massive de glutamate pendant l'épisode épileptiforme. De cette libération découle une conversion massive de glutamate en glutamine par les astrocytes. De ce fait, l'inhibition du cycle Glu-Gln permettrait de diminuer les activités épileptiques.^{110, 111}

Dans le cerveau humain, l'activité de la glutamine synthétase diminue avec l'âge. Cette déperdition est exacerbée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. La GS étant très sensible à l'oxydation, les radicaux libres engendrent un changement conformationnel qui rend l'enzyme inactive.^{112, 113} Que ce soit par une baisse de la quantité de protéines ou par une perte de fonction enzymatique, la glutaminase n'est plus capable de remplir son rôle dans les régions cérébrales atteintes par la maladie.

Le potentiel thérapeutique du cycle glutamate-glutamine est considérable. La découverte de composés sélectifs de chaque acteur de ce cycle en font autant d'outils pharmacologiques permettant à la recherche de progresser et de révéler de nouveaux potentiels thérapeutiques.

105. Kvamme, E., *et al. J. Neurosci. Res.* **2001**, 66, 951-8.
106. Chan, P. H. *Stroke.* **1996**, 27, 1124-9.
107. Dringen, R. *Prog. Neurobiol.* **2000**, 62, 649-671.
108. Chen, Y., *et al. J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, 23, 137-49.
109. Ramonet, D., *et al. Hippocampus.* **2004**, 14, 586-94.
110. Bacci, A., *et al. J. Neurophysiol.* **2002**, 88, 2302-2310.
111. Kegeles, L. S., *et al. Arch. Gen. Psychiatry.* **2012**, 69, 449-59.
112. Schor, N. F. *Brain Res.* **1988**, 456, 17-21.
113. Butterfield, D. A., *et al. J. Neurochem.* **1997**, 68, 2451-7.

*III. Les transporteurs vésiculaires
du glutamate*

III. Les transporteurs vésiculaires du glutamate

III.1 Identification des VGLUTs

A l'instar des autres neurotransmetteurs classiques, le glutamate est accumulé dans des vésicules synaptiques par des transporteurs protons-dépendants. Ces protéines, appelées VGLUTs pour transporteurs vésiculaires du glutamate, sont des marqueurs spécifiques de la transmission glutamatergique. Ces transporteurs ont été identifiés dans les années 2000 et sont au nombre de trois, appelés VGLUT1-3.¹¹⁴⁻¹¹⁶

Le transporteur de phosphate inorganique dépendant du sodium, connu sous le nom de BNPI (Brain specific Na⁺-dependent inorganic transporter) a été cloné en 1994.¹¹⁷ Il a été montré que les BNPI sont fortement exprimés dans le cerveau et plus particulièrement sur les vésicules des synapses excitatrices.^{114, 118} Des expériences de transfection de BNPI dans des neurones GABAergiques en culture ont montré que l'expression de cette protéine conférait aux neurones la possibilité de libérer du glutamate.¹¹⁶ Ceci a été démontré par l'enregistrement de courants post-synaptiques excitateurs rapides sur les neurones cibles, réponses qui pouvaient être bloquées par des antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA.¹¹⁶ Ces expériences ont constitué la première démonstration que le BNPI agissait comme un transporteur spécifique du glutamate dans les vésicules synaptiques. Finalement en 2000, deux études ont confirmé le rôle de BNPI dans le transport du glutamate vers l'intérieur des vésicules synaptiques. Ainsi, BNPI a été renommé en transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT1.^{114, 116}

Peu de temps après, Aihara *et al.* ont trouvé une protéine hautement homologue de VGLUT1. Ce transporteur appelé DNPI (Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate transporter) possède 82% d'homologie avec le BNPI et est fortement exprimé au niveau des terminaisons axonales cérébrales.¹¹⁹⁻¹²¹ De nombreuses études ont établi que l'expression de DNPI est située au niveau des neurones glutamatergiques et qu'il joue un rôle dans le transport vésiculaire du glutamate. Ainsi, DNPI prit l'appellation de VGLUT2.¹²¹⁻¹²⁴

VGLUT3, quant à lui, a été identifié en 2002 mais son rôle est moins bien connu.¹²⁵⁻¹²⁸ Il possède respectivement 72 % et 75 % d'homologie de séquence avec VGLUT1 et VGLUT2. Cependant,

114. Edwards, R. H., *et al. Science*. **2000**, 289, 957-960.
115. Gasnier, B. *Biochimie*. **2000**, 82, 327-337.
116. Takamori, S., *et al. Nature*. **2000**, 407, 189-94.
117. Ni, B. H., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1994**, 91, 5607-5611.
118. Edwards, R. H., *et al. J. Neurosci*. **1998**, 18, 8648-8659.
119. Aihara, Y., *et al. J. Neurochem*. **2000**, 74, 2622-2625.
120. Hisano, S., *et al. Mol. Brain Res*. **2000**, 83, 34-43.
121. Fujiyama, F., *et al. J. Comp. Neurol*. **2001**, 435, 379-87.
122. Herzog, E., *et al. J. Neurosci*. **2001**, 21, RC181.
123. Sakata-Haga, H., *et al. Brain Res*. **2001**, 902, 143-55.
124. Takamori, S., *et al. J. Neurosci*. **2001**, 21, RC182.
125. Fremeau, R. T., Jr., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, 99, 14488-93.
126. Gras, C., *et al. J. Neurosci*. **2002**, 22, 5442-51.
127. Schafer, M. K., *et al. J. Biol. Chem*. **2002**, 277, 50734-48.
128. Takamori, S., *et al. EMBO Rep*. **2002**, 3, 798-803.

contrairement aux deux autres transporteurs, l'expression de VGLUT3 n'est pas localisée exclusivement dans les terminaisons nerveuses mais est aussi présente au niveau des corps cellulaires et des dendrites des neurones dans lesquels il est exprimé.¹²⁶

L'expression de VGLUT1 et/ou de VGLUT2 confère à la cellule la capacité de libérer du glutamate, de ce fait ces transporteurs sont devenus des outils intéressants pour l'étude du système glutamatergique.

III.2 VGLUTs et phylogénie

III.2.a Généralités

Le stockage vésiculaire et l'exocytose de neurotransmetteurs sont essentiels pour la transmission chimique au niveau neuronal ainsi qu'au niveau des cellules endocrines. Ces transporteurs appartiennent à une superfamille de protéines membranaires de transport appelés SLC, constituée de 300 protéines organisées en 51 familles.

Tableau III-1 : Transporteurs Vésiculaires de Neurotransmetteurs d'après Omote *et al.*¹²⁹

| Gène | Transporteur | Substrat | Force motrice et mode de transport |
|----------------|--|--|---|
| SLC17A5 | Transporteur vésiculaire d'acide excitateur (VEAT) | Glutamate, Aspartate | $\Delta\psi$, uniport |
| SLC17A6 | Transporteur vésiculaire de glutamate 2 (VGLUT2) | Glutamate | $\Delta\psi$, uniport |
| SLC17A7 | Transporteur vésiculaire de glutamate 1 (VGLUT1) | Glutamate | $\Delta\psi$, uniport |
| SLC17A8 | Transporteur vésiculaire de glutamate 3 (VGLUT3) | Glutamate | $\Delta\psi$, uniport |
| SLC17A9 | Transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT) | ATP, ADP | $\Delta\psi$, uniport |
| SLC18A1 | Transporteur vésiculaire de monoamines 1 (VMAT1) | Sérotonine, adrénaline, noradrénaline, histamine, dopamine | $\Delta\psi$, ΔpH , H^+ , antiport |
| SLC18A2 | Transporteur vésiculaire de monoamines 2 (VMAT2) | Sérotonine, adrénaline, noradrénaline, histamine, dopamine | $\Delta\psi$, ΔpH , H^+ , antiport |
| SLC18A3 | Transporteur vésiculaire d'acétylcholine (VACHT) | Acétylcholine | $\Delta\psi$, ΔpH , H^+ , antiport |
| SLC32A1 | Transporteur vésiculaire de GABA (VGAT) | GABA, glycine | $\Delta\psi$, Cl^- cotransport |

Jusqu'à présent, neuf transporteurs vésiculaires ont été identifiés et classés en trois familles en fonction de leur substrat ainsi que de leur similarité de séquence (**Tableau III-1**).¹²⁹

129. Omote, H., *et al.* *Biochemistry*. **2011**, 50, 5558-5565.

Les trois familles de transporteurs, que sont les SLC17, SLC18 et SLC32, sont dédiées respectivement à la recapture d'anions, de cations et de neurotransmetteurs.^{130, 131} De plus, outre la spécificité de substrat, les trois familles de transporteurs diffèrent par des forces motrices et des modes de régulation différents.

III.2.b SLC17

La famille des SLC17 est impliquée dans le transport vésiculaire de neurotransmetteurs anioniques comme le glutamate ou l'aspartate (**Figure III-1**). Cette famille contient neuf membres et notamment les trois transporteurs vésiculaires du glutamate VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3 ainsi que les transporteurs vésiculaires d'acides aminés excitateurs (VEAAT). Cette famille est aussi composée de transporteurs phosphate sodium-dépendant (NPT1, NPT3, NPT4 et NPT homologue). Les NPTs sont dédiés au transport d'anions organiques pour l'élimination rénale des xénobiotiques. Les membres de la famille des transporteurs des SLC17 possèdent des propriétés structurales et biochimiques similaires même s'ils n'ont pas la même localisation ou le même substrat.

Figure III-1 : Arbre phylogénétique de la famille des SLC17 d'après Miyaji *et al.*¹³²

En 2008, Sawada *et al.* ont identifié le neuvième membre de cette famille qu'est le transporteur vésiculaire de nucléotides (VNUT).¹³³ VNUT permet l'incorporation de l'ATP, connu comme neurotransmetteur de la signalisation purinergique, dans les vésicules de stockage. Cependant, son existence est aujourd'hui remise en cause.

-
- 130. Gasnier, B. *Pflügers Archiv.* **2004**, 447, 756-759.
 - 131. Reimer, R. J., *et al.* *Pflügers Archiv.* **2004**, 447, 629-635.
 - 132. Miyaji, T., *et al.* *J. Neurochem.* **2011**, 119, 1-5.
 - 133. Sawada, K., *et al.* *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* **2008**, 128, 65-66.

Les SLC17 sont des transporteurs phosphate de type I composés de neuf gènes divisés en quatre sous-familles :

- *SLC17A1-4* : les NPTs cotransportent un ion sodium et un phosphate inorganique,
- *SLC17A5* : sialine, cotransporteur d'H⁺ et d'acide sialique,
- *SLC17A6-8* : les transporteurs vésiculaires du glutamate,
- *SLC17A9* : le transporteur vésiculaire de nucléotides.

III.2.c SLC18

Les transporteurs de la famille des SLC18 permettent l'accumulation vésiculaire de neurotransmetteurs cationiques comme l'acétylcholine, la sérotonine, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline.^{134, 135}

Cette famille est composée de trois membres :

- transporteurs vésiculaires de monoamine 1 (VMAT1) principalement exprimés dans les cellules endocrines périphériques des glandes surrénales,
- transporteurs vésiculaires de monoamine 2 (VMAT2) principalement exprimés dans les neurones aminergiques du système nerveux central,
- transporteurs vésiculaires d'acétylcholinestérase (VACHT).

VMAT1 et 2 transportent la dopamine, la sérotonine, l'adrénaline et la noradrénaline dans les vésicules de transport avec une affinité inférieure au micromolaire. Des études de recapture de monoamines menées sur des granules de chromaffine de glandes médullosurrénales ont montré que le transport d'une monoamine cytoplasmique est couplé à un efflux de deux protons.¹³⁶

Le transporteur d'acétylcholine (VACHT), quant à lui, possède une affinité inférieure pour son substrat que VMAT1 et 2 puisqu'elle est de l'ordre du millimolaire.¹³⁶ De plus, le *turnover* de VACHT ($\sim 1\text{S}^{-1}$) est plus lent que celui des VMATs.¹³⁷ Chez le rat, VACHT possède une forte homologie avec les VMATs, respectivement 40 % et 65 % d'identité et de similarité de séquence. La protéine serait alors composée de douze domaines transmembranaires avec les régions N- et C- terminales localisées au niveau du cytoplasme.^{138, 139}

Les transporteurs de la famille des SLC18 utilisent la force motrice d'un gradient électrochimique de protons fourni par une V-ATPase (ΔpH) et d'un potentiel de membrane ($\Delta\psi$) pour transporter les neurotransmetteurs.

134. Parsons, S. M. *FASEB J.* **2000**, 14, 2423-34.

135. Eiden, L. E., et al. *Pflügers Archiv.* **2004**, 447, 636-40.

136. Chaudhry, F. A., et al. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, 48, 277-301.

137. Varoqui, H., et al. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 27229-32.

138. Erickson, J. D., et al. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 21929-32.

139. Roghani, A., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, 91, 10620-4.

III.2.d SLC32

A l'heure actuelle, seuls les transporteurs vésiculaires de GABA (VGAT) appartiennent à la famille des SLC32. Ces protéines peuvent transporter des substrats comme le GABA ou la glycine, molécules ayant une charge globale nulle. Ces transporteurs sont également connus sous le nom de transporteurs vésiculaires d'acides aminés inhibiteurs (VIAAT) car le GABA et la glycine sont des neurotransmetteurs inhibiteurs. L'intégration du GABA dans la vésicule de transport nécessite le cotransport d'un ion Cl^- .¹⁴⁰

III.2.e Conclusions

La **Figure III-2** permet de résumer les différentes propriétés de transport des membres des SLC 17, 18 et 32.

Figure III-2 : Propriétés de transport des membres des sous-familles SLC17, SLC18 et SLC32 d'après Omote *et al.*¹²⁹

III.3 Distributions des transporteurs vésiculaires du glutamate

III.3.a Distribution au niveau cérébral

III.3.a.i VGLUT1 et VGLUT2

Les deux isoformes, VGLUT1 et VGLUT2, sont principalement exprimées au niveau des neurones glutamatergiques et leur expression est complémentaire au niveau du système nerveux central.

VGLUT1 est localisé au niveau du néocortex et plus particulièrement au niveau des couches I à III, au niveau du cortex entorhinal et piriforme ainsi que dans l'hippocampe, l'amygdale et le subiculum.

VGLUT2 est localisé dans le bulbe olfactif, la couche IV du cortex cérébral, les couches granulaires du gyrus dentelé, le thalamus, l'hypothalamus et le tronc cérébral.^{121, 122, 141-143}

140. Moriyama, Y., *et al.* *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 35073-35078.

Dans le cervelet, VGLUT1 est exprimé au niveau des fibres parallèles et VGLUT2 est exprimé au niveau des fibres grimpantes et des dendrites des cellules de Purkinje.^{141, 144} Cette complémentarité de distribution a laissé penser qu'il y a différentes catégories de neurones glutamatergiques.

Bi : noyau basolatérale, Ctx : cortex, Dg : gyrus dentelé, Hc : Hippocampe, M : amygdale,
VMH : noyau ventromédial

Figure III-3 : Expression cérébrale des ARNm de VGLUTs d'après Edwards et al.¹⁴⁵

Ainsi, VGLUT1 est présent sur des synapses possédant une faible probabilité de libération. Ces synapses sont d'ailleurs connues pour posséder une potentialisation à long terme (PLT). Contrairement aux VGLUT2 qui sont présents sur des synapses à haute probabilité de libération, synapses dites DLT pour dépression à long terme.^{141, 146} Ces informations coïncident avec le fait que VGLUT2 est retrouvé à des stades précoces du développement. Cependant, il a été montré que dans certains neurones, les deux isoformes peuvent être coexprimées. C'est le cas au niveau de l'hippocampe, du néocortex, de la moelle épinière et du cervelet.¹⁴⁷⁻¹⁵¹ Ainsi, il a été proposé que dans ces neurones, les VGLUTs peuvent être séparés en différentes populations synaptiques ou colocalisés sur la même synapse. Cependant, les ARNm de VGLUT1 et VGLUT2 ainsi que leurs protéines ont été isolés sur des neurones dopaminergiques,

-
141. Edwards, R. H., et al. *Neuron*. **2001**, 31, 247-260.
 142. Kaneko, T., et al. *Neurosci. Res.* **2002**, 42, 243-50.
 143. Kaneko, T., et al. *J. Comp. Neurol.* **2002**, 444, 39-62.
 144. Hisano, S., et al. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2002**, 107, 23-31.
 145. Edwards, R. H., et al. *Trends Neurosci.* **2004**, 27, 98-103.
 146. Erickson, J. D., et al. *J. Neurosci.* **2002**, 22, 142-155.+
 147. Herzog, E., et al. *J. Neurochem.* **2006**, 99, 1011-8.
 148. Nakamura, K., et al. *J. Comp. Neurol.* **2005**, 492, 263-88.
 149. Liguz-Leczna, M., et al. *Acta Neurobiol. Exp.* **2007**, 67, 207-18.
 150. Persson, S., et al. *J. Comp. Neurol.* **2006**, 497, 683-701.
 151. Boulland, J. L., et al. *J. Comp. Neurol.* **2004**, 480, 264-80.

GABAergiques et cholinergiques au niveau du cervelet et dans une zone subcorticale du striatum.¹⁵²⁻¹⁵⁵ Il a alors été proposé que la colibération du glutamate avec du GABA pourrait contribuer à inhiber la plasticité synaptique. De plus, il se pourrait que la colibération du glutamate et d'acétylcholine active un type particulier de synapses, les synapses silencieuses. Ces synapses, considérées comme des synapses immatures, ne possèdent pas de récepteurs AMPA nécessaires à la génération d'un potentiel d'action. Ainsi, un colargage de glutamate et d'acétylcholine pourrait provoquer une dépolarisation de la membrane post-synaptique sans l'aide des récepteurs AMPA.^{156, 157}

III.3.a.ii VGLUT3

Le troisième transporteur vésiculaire du glutamate est localisé sur un nombre limité de neurones glutamatergiques dans diverses régions cérébrales comme le néocortex, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le noyau de raphé et la substance noire elle-même localisée au niveau du mésencéphale et du diencephale.^{125-127, 158} De plus, VGLUT3, est exprimé dans des populations de synapses symétriques et a été retrouvé dans des neurones GABAergiques au niveau de l'hippocampe et du cortex, dans des neurones cholinergiques au niveau du striatum et dans les neurones sérotoninergiques du noyau de raphé.^{126, 158} Ces informations suggèrent que le glutamate peut être stocké et même colibéré avec d'autres neurotransmetteurs tels que le GABA ou la sérotonine afin de moduler la transmission synaptique.

La distribution de VGLUT3 est, comme cela a été décrit précédemment, assez répandue mais toutefois restreinte à certaines populations de neurones. Ce transporteur est d'ailleurs le seul présent sur les dendrites des neurones striataux.¹²⁵ Dans certaines régions, telles que le septum, l'amygdale, l'hypothalamus, la substance noire ou le cortex entorhinal, des marqueurs immunochimiques spécifiques de VGLUT3 se sont révélés être positifs bien qu'aucun ARNm de VGLUT3 n'ait pu être détecté.¹⁴⁷

Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2, VGLUT3 n'est pas exclusivement localisé sur des terminaisons pré-synaptiques. En effet, ce dernier a été retrouvé sur des dendrites post-synaptiques et dans certains corps cellulaires.^{125, 145} Ces informations témoignent de l'implication de VGLUT3 dans la libération du glutamate au niveau somatodendritique. Il jouerait alors un rôle autre que simplement de transporteur au niveau des neurones.¹⁵⁸

Contrairement à VGLUT1 et VGLUT2, qui sont localisés sur les mêmes terminaisons axonales, VGLUT3 n'est pas colocalisé avec les autres isoformes de VGLUTs.¹⁵¹

Ainsi, VGLUT3 délimite un nouveau sous-ensemble de fibres excitatrices suggérant un nouveau rôle pour la transmission glutamatergique (**Figure III-3**).

152. Dal Bo, G., et al. *J. Neurochem.* **2004**, 88, 1398-405.

153. Trudeau, L. E. *J. Psychiatry Neurosci.* **2004**, 29, 296-310.

154. Kawano, M., et al. *J. Comp. Neurol.* **2006**, 498, 581-92.

155. Danik, M., et al. *J. Neurosci. Res.* **2005**, 81, 506-21.

156. Duguid, I. C., et al. *Nature Neurosci.* **2004**, 7, 525-533.

157. Seal, R. P., et al. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, 137-50.

158. Herzog, E., et al. *Neuroscience.* **2004**, 123, 983-1002.

III.3.a.iii Conclusions

Les transporteurs vésiculaires du glutamate sont largement distribués au niveau du cerveau et principalement VGLUT1 et VGLUT2 qui possèdent une distribution complémentaire.

VGLUT3, quant à lui, n'a pu être isolé que dans certaines régions cérébrales.

La distribution des trois sous-types de transporteurs vésiculaire du glutamate est résumée dans le **Tableau III-2**.

Tableau III-2 : Distributions régionales des VGLUTS dans le cerveau de rat d'après Hisano *et al.*¹⁵⁹

| Régions | VGLUT1 | | VGLUT2 | | VGLUT3 | |
|----------------------------|--------|----------|--------|----------|--------|----------|
| | ARN | Protéine | ARN | Protéine | ARN | Protéine |
| Rétine | ++ | + | + | + | + | + |
| Bulbe olfactif | ++ | +++ | + | ++ | | + |
| Néocortex | +++ | +++ | + | ++ | | + |
| Striatum | | +++ | | ++ | + | + |
| Noyaux accumbens | | +++ | | +++ | | + |
| Septum | | ++ | + | ++ | | |
| Cortex piriforme | + | +++ | + | + | | |
| Amygdale | ++ | + | ++ | + | | |
| Hippocampe | +++ | +++ | + | + | + | + |
| Habénala | + | + | ++ | ++ | | |
| Noyaux dorsaux thalamiques | | +++ | +++ | ++ | | |
| Noyaux sous-thalamique | | + | +++ | + | | |
| Hypothalamus | | + à ++ | ++ | ++ | | |
| Mésencéphale | | + à ++ | +++ | ++ | +++ | + |
| Cortex cérébelleux | ++ | +++ | | + | | |

+ : Peu abondant, ++ : intermédiaire, +++ : très abondant

III.3.b Les autres distributions des transporteurs vésiculaires du glutamate

Outre leur distribution au niveau du système nerveux central, les trois isoformes des transporteurs vésiculaires du glutamate peuvent être retrouvées au niveau de la rétine, de la moelle épinière, dans le système nerveux périphérique (SNP), aussi bien que dans les cellules non-neuronales.

159. Hisano, S. *Anat. Sci. Int.* **2003**, 78, 191-204.
160. Li, J. L., *et al. J. Comp. Neurol.* **2003**, 463, 212-20.
161. Li, J. L., *et al. J. Comp. Neurol.* **2003**, 457, 236-49.
162. Oliveira, A. L., *et al. Synapse.* **2003**, 50, 117-29.

III.3.b.i Distribution des VGLUTs dans les cellules nerveuses

Ainsi les VGLUTs sont distribués au niveau du ganglion trigéminal et des ganglions de la racine dorsale.¹⁶⁰⁻¹⁶² Là, ils sont impliqués dans la nociception.¹⁶² Ces transporteurs sont aussi localisés au niveau des terminaisons laminaires intraganglionnaires de l'œsophage et des neurones entériques.^{163, 164} Dans ces neurones, le glutamate est le principal neurotransmetteur qui permet de transférer l'information de la muqueuse de l'intestin au plexus intestinal et au cerveau.¹⁶⁴

Le glutamate est aussi stocké et libéré comme un neurotransmetteur dans certaines populations de fibres nerveuses pulmonaires qui sont impliquées dans la transmission périphérique des stimuli sensoriels provenant des poumons.¹⁶⁵

Au niveau de la rétine, les trois isoformes ont une distribution complémentaire. VGLUT1 est exprimé au niveau des cellules photoréceptrices et des cellules bipolaires alors que VGLUT2 est exprimé au niveau des cellules ganglionnaires.¹⁶⁶ Ces cellules sont d'ailleurs connues pour utiliser le L-glutamate comme neurotransmetteur.

VGLUT3, quant à lui, a été localisé dans un sous-ensemble de cellules amacrine.¹²⁵ Coïncidant avec l'expression de VGLUT2 dans les cellules ganglionnaires de la rétine, l'immunoréactivité de VGLUT2 est dominante dans le noyau géniculé basolatéral et les tubercules quadrijumeaux (colliculi supérieur), lieu où les cellules ganglionnaires rétinienne se terminent.

Au niveau du SNC, VGLUT1 et 2 sont coexprimés avec la substance P dans les afférences primaires nociceptives des cornes médullaires et dorsales de la moelle épinière suggérant ainsi un rôle des VGLUTs dans la nociception.^{161, 162}

III.3.b.ii VGLUTs dans les cellules non-neuronales

En dehors du système nerveux les VGLUTs peuvent être isolés dans des cellules non-neuronales sécrétant du glutamate dans différents organes comme la glande pinéale, les îlots de Langerhans, les os et les testicules.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰

➤ VGLUTs dans le pancréas

Les cellules des îlots de Langerhans expriment des récepteurs du glutamate et des transporteurs du glutamate Na⁺-dépendant. Il a été montré que la stimulation de ces récepteurs a un effet sur la sécrétion de l'insuline et/ou du glucagon. Les recherches effectuées sur ces îlots ont permis de mettre en avant le fait que VGLUT1 et 2 sont présents sur les granules sécrétant le glucagon dans les cellules α , suggérant alors un

-
- 163. Raab, M., et al. *Cell Tissue Res.* **2003**, 312, 141-8.
 - 164. Tong, Q., et al. *Neuroreport.* **2001**, 12, 3929-34.
 - 165. Brouns, I., et al. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, 121, 1-12.
 - 166. Mimura, Y., et al. *Neuroreport.* **2002**, 13, 1925-8.
 - 167. Hayashi, M., et al. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 1966-74.
 - 168. Morimoto, R., et al. *J. Neurochem.* **2003**, 84, 382-91.
 - 169. Redecker, P., et al. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, 51, 809-19.
 - 170. Hinoi, E., et al. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 1-13.

costockage et une colibération de glutamate et de glucagon lors d'une stimulation due à une faible concentration de glucose.¹⁶⁷ Ainsi, les cellules α ont été qualifiées de cellules endocrines glutamatergiques. VGLUT1 et VGLUT2 sont aussi exprimés dans les cellules F. Comme pour les cellules α , il apparaît que le glutamate est cosécrété avec le polypeptide pancréatique dans des conditions de faible concentration en glucose.¹⁷¹

Comme VGLUT1, 2 et 3 ne sont pas exprimés dans les cellules β et les cellules δ , il apparaît que ces cellules ne sont pas des cellules endocrines glutamatergiques.

➤ VGLUTs dans les intestins et l'estomac

Au niveau du tractus gastro-intestinal, il y a plus de vingt types de cellules endocrines dont certaines expriment VGLUT2.¹⁷¹ De la même manière que pour les cellules α des îlots de Langerhans, les cellules L cosécrètent le glutamate et l'incrétine (ou GLP-1 pour glucagon-like peptide 1).

Au niveau de l'estomac, les transporteurs vésiculaires de type 2 ont pu être caractérisés au niveau des muqueuses, du pylore et principalement au niveau de la poche gastrique.

➤ VGLUTs dans les os

Les ostéoblastes et les ostéoclastes expriment des récepteurs du glutamate et des transporteurs de type GLAST Na^+ -dépendant. Ceci indique alors un rôle du glutamate dans le métabolisme osseux et plus spécialement dans le maintien de la masse osseuse.^{172, 173} Ainsi, le gène de VGLUT1 a pu être caractérisé dans les ostéoclastes.¹⁷⁴

➤ VGLUTs dans les testicules

Les tubes séminifères sont le siège de la formation des spermatozoïdes dans les testicules. La paroi de ces tubes est composée de cellules de Sertoli et de cellules germinales qui donnent lieu à la prolifération des spermatogonies. Ce sont les cellules germinales primordiales qui subissent une série de divisions cellulaires et de différenciations conduisant aux spermatozoïdes matures. Des études immunohistochimiques ont mis en évidence l'expression de récepteurs du glutamate suggérant la présence d'un système glutamatergique et la présence des VGLUTs dans les spermatides.^{169, 171}

III.3.c Conclusions

Les transporteurs vésiculaires du glutamate ont une distribution très large que ce soit au niveau cérébral ou dans de nombreux organes.

171. Hayashi, M., *et al.* *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, 51, 1375-90.

172. Gu, Y., *et al.* *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 34252-9.

173. Skerry, T. M., *et al.* *Curr. Pharm. Des.* **2001**, 7, 737-50.

174. Hinoi, E., *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, 297, 452-8.

Outre le rôle de neurotransmetteur exciteur, il a été proposé que le système glutamatergique périphérique utilise le glutamate comme un messenger intercellulaire communiquant entre les cellules voisines. Ainsi, la nature de ce mode de transmission du signal *via* le glutamate serait différente en fonction des localisations à savoir le système nerveux central, le système nerveux périphérique et les cellules non-neuronales.¹⁷⁵

III.4 Les VGLUTs durant le développement post-natal

L'expression des trois transporteurs vésiculaires du glutamate est âge-dépendant et la régulation du développement des VGLUTs est différente en fonction des régions cérébrales.

III.4.a VGLUT1 et VGLUT2

VGLUT2 est le transporteur vésiculaire du glutamate prédominant pendant la phase embryonnaire.^{148, 151, 176} Les terminaisons axonales VGLUT2-positives semblent être matures précocement puisqu'elles sont distribuées de façon ubiquitaire dans le télencéphale du premier jour postnatal à l'âge adulte. L'immunoréactivité de VGLUT2 tend à augmenter dans le cortex avec l'âge, cependant dans le cervelet, il décline d'un facteur quatorze après la première semaine postnatale.^{149, 151} Contrairement à VGLUT2, VGLUT1 semble être plus lent à se mettre en place puisqu'il n'a pu être observé dans les structures limbiques à la naissance.^{148, 151, 176} Pendant les trois semaines de vie postnatale, VGLUT1 devient progressivement l'isoforme majeur dans de nombreuses régions cérébrales.^{148, 151} Edwards *et al.* ont d'ailleurs montré que ce sous-type est responsable de 80 % de la recapture vésiculaire du glutamate chez le rongeur adulte grâce à des souris délétères de VGLUT1.¹⁴⁵

Durant le développement postnatal dans le cervelet, dans les cellules pyramidales de l'hippocampe et dans une sous population de neurones corticaux de souris, un changement de proportion entre VGLUT2 et VGLUT1 peut être noté. Ce changement est lié à une maturation physiologique des connections neuronales dans des structures particulières.¹⁷⁷ Ce phénomène de changement de sous-type est lié à la coexpression des deux isoformes de VGLUTs dans la même terminaison nerveuse. Une telle colocalisation peut être observée de façon transitoire à des stades précoces postnataux ou de façon permanente jusqu'à l'âge adulte.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ De plus, cette colocalisation pourrait être impliquée dans la période de haute plasticité neuronale.

Il a été montré que le niveau de VGLUT1 et VGLUT2 contrôle l'efficacité de la neurotransmission et que ces deux isoformes peuvent être colocalisés sur les mêmes vésicules synaptiques. Les neurones exprimant les deux isoformes pourraient être plus efficaces et répondre différemment afin d'être régulés pendant le développement postnatal.^{147, 158, 178, 179}

175. Moriyama, Y., *et al.* *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22314-20.

176. Gras, C., *et al.* *Neuropharmacology*. **2005**, 49, 901-11.

177. Miyazaki, T., *et al.* *Eur. J. Neurosci.* **2003**, 17, 2563-72.

178. Wojcik, S. M., *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, 101, 7158-63.

179. Moechars, D., *et al.* *J. Neurosci.* **2006**, 26, 12055-66.

III.4.b VGLUT3

Le niveau d'expression de VGLUT3 augmente progressivement dans le cortex bien qu'il décline d'un facteur cinq entre P7 et l'âge adulte.¹⁵¹ Comme VGLUT1, l'expression de ce sous-type augmente très rapidement après la naissance pour se stabiliser aux environs de la troisième semaine de vie postnatale. Contrairement à VGLUT 1 et 2 dont l'expression croît et décroît, respectivement de façon linéaire, VGLUT3 présente un profil d'expression biphasique.¹⁷⁶ Le premier pic d'expression est visible aux alentours de P10, il diminue jusqu'à P15 puis il augmente progressivement jusqu'à P90, c'est-à-dire l'âge adulte.¹⁷⁶ Cette différence est peut être due à une particularité de localisation, ou à un artefact expérimental.

Cependant, il a été montré que dans certaines régions les VGLUTs sont exprimés de façon transitoire. De même dans certaines régions, un isoforme de VGLUT peut être remplacé par un autre. Une expression transitoire de VGLUT3 a pu être observée dans le tronc cérébral auditif entre P0 et P12. Il serait certainement impliqué dans la maturation des projections glycynergiques de cette région.¹⁸⁰

VGLUT3 est aussi présent dans le caudé-putamen, l'accumbens et l'hippocampe à partir de P1. L'analyse des localisations cérébelleuses a permis de montrer l'expression transitoire de VGLUT3 dans les circuits GABAergiques en cours de maturation.¹⁸¹

III.5 Propriétés des VGLUTS

L'importance des transporteurs vésiculaires du glutamate a été confirmée par des études menées sur des souris rendues génétiquement modifiées pour le ou les gènes de VGLUTs.^{178, 179, 182-185}

Des souris dépourvues du gène de VGLUT1 sont atteintes de pathologies neurologiques, de cécité et d'incoordination.^{178, 182, 183} Les vésicules synaptiques isolées de ces souris montrent un taux de récepteurs du glutamate moins important que les souris de phénotype sauvage et une diminution de la neurotransmission.¹⁷⁸

L'inactivation du gène de VGLUT2, quant à elle, cause des décès prématurés. Ces mortalités prénatales sont dues à l'expression prédominante de VGLUT2 pendant le stade embryonnaire et les premiers jours postnataux.^{177, 179}

Des expériences de perturbation du gène de VGLUT3 réalisées par Seal *et al.* ont permis de mettre en évidence l'implication de ce transporteur dans l'audition ainsi que dans l'hypersensibilité mécanique.^{74, 75}

Les études des propriétés cinétiques des VGLUTs ont été réalisées sur des vésicules synaptiques. L'inhibition du transport du glutamate par des ionophores a permis de caractériser la principale force motrice de ces transporteurs comme le potentiel de membrane ($\Delta\psi$), bien que le gradient de proton (ΔpH) joue lui

180. Blaesse, P., *et al.* *Cell Tissue Res.* **2005**, 320, 33-50.
181. Gillespie, D. C., *et al.* *Nature Neurosci.* **2005**, 8, 332-8.
182. Fremeau, R. T., Jr., *et al.* *Science.* **2004**, 304, 1815-9.
183. Tordera, R. M., *et al.* *Eur. J. Neurosci.* **2007**, 25, 281-290.
184. Seal, R. P., *et al.* *Neuron.* **2008**, 57, 263-75.
185. Seal, R. P., *et al.* *Nature.* **2009**, 462, 651-655.
186. Naito, S., *et al.* *J. Neurochem.* **1985**, 44, 99-109.
187. Bai, L., *et al.* *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 36764-9.
188. Carlson, M. D., *et al.* *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 7369-76.

aussi un rôle primordial.^{114, 122, 126, 141, 146, 175, 186-190} La faible affinité du glutamate pour les VGLUTs, de l'ordre de 1 à 5 mM, implique une forte concentration de neurotransmetteurs au niveau cytoplasmique.^{114, 122, 126, 127, 141, 146, 186-193} De plus, il est important de noter que les VGLUTs reconnaissent exclusivement le glutamate. Cette exclusivité de substrat n'a d'ailleurs pas été remarquée chez les autres membres des SLC17.

Les ions Cl^- régulent le transport du glutamate en contrôlant $\Delta\mu\text{H}^+$ et l'activité des VGLUTs. L'augmentation de la concentration en Cl^- provoque une augmentation de ΔpH et une diminution de $\Delta\psi$. Une faible concentration de Cl^- active les VGLUTs alors qu'elle est inhibée par une forte concentration à cause de la perte de force motrice. Les cétones inactivent les VGLUTs en inhibant les liaisons du Cl^- .

Figure III-4 : Dépendance et régulation du transport du glutamate par les ions chlorures d'après Omote *et al.*¹²⁹ et El Mestikawy *et al.*¹⁹⁴

Une autre caractéristique de ces transporteurs est la nécessité d'ions chlorures. Le K_m du chlorure est de 0,2 mM.¹⁹⁵ Ainsi, à faible concentration en ions Cl^- , le transport du glutamate est négligeable. En revanche, lors de l'augmentation de la concentration en chlorure le transport vésiculaire est activé. L'activité maximale est atteinte pour une concentration de 4 mM. Au-dessus de cette concentration, le transport du glutamate décroît (**Figure III-4**).¹²⁹

Afin d'expliquer l'implication des ions chlorures dans le transport du glutamate, deux hypothèses de mécanisme d'action ont été émises par Chaudhry *et al.* en 2008.¹⁹⁶ L'augmentation de l'activité de recapture

189. Juge, N., *et al.* *Ibid.* **2006**, 281, 39499-506.
190. Juge, N., *et al.* *Neuron*. **2010**, 68, 99-112.
191. Ottersen, O. P. *Anat. Embryol.* **1989**, 180, 1-15.
192. Attwell, D., *et al.* *Neuron*. **1993**, 11, 401-7.
193. Schenck, S., *et al.* *Nature Neurosci.* **2009**, 12, 156-62.
194. El Mestikawy, S., *et al.* *Nature Rev. Neurosci.* **2011**, 12, 425.
195. Kraineva, J., *et al.* *Langmuir*. **2005**, 21, 3559-71.
196. Chaudhry, F. A., *et al.* *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, 77-106.

serait due : soit à un afflux plus important d'ion Cl^- dans la lumière vésiculaire, soit il existe un site allostérique sensible aux anions. Cette dernière hypothèse a été validée par Omote *et al.* en 2011, en montrant que les ions chlorures agissent sur un site qui leur est dédié (**Figure III-4**).¹²⁹

Une étude de mutagenèse dirigée a permis de révéler que la mutation systématique de résidus hydrophiles transmembranaires des VGLUTs est délétère sur le transport du glutamate.¹⁸⁹ Ainsi, il a été montré que les His 128, Arg 184 et Glu 191 sont essentiels pour l'activité de VGLUT2. De plus, il semblerait que parmi ces trois résidus, l'Arg184 est l'acide aminé le plus important car l'effet de sa mutation sur l'activité est plus délétère que lors de la mutation des His128 et Glu191. Ces trois résidus sont d'ailleurs conservés chez tous les membres des SLC17, suggérant un rôle commun tel que le processus d'activation par Cl^- .¹²⁹

Les premiers transporteurs vésiculaires du glutamate clonés ont été caractérisés comme des transporteurs de phosphate inorganique. Des études menées sur des VGLUT2 purifiés ont montré une activité de transport de phosphate inorganique Na^+ -dépendante. De plus, cette activité n'est pas inhibée par le Bleu Evans, un inhibiteur connu du transport du glutamate. Contrairement au transport de glutamate qui nécessite des ions chlorures, le transport de phosphate n'a nullement besoin de ces ions. De plus, la mutation des His129, Arg184 et Glu191 n'a aucun effet sur cette activité de transport de phosphate. Ainsi, les VGLUTs possèdent une double machinerie de transport $\Delta\psi$ -dépendante pour le transport de glutamate et gradient de sodium pour le transport de phosphate inorganique. Cette multifonctionnalité est d'ailleurs une des caractéristiques des transporteurs de la famille des SLC17.¹²⁹

III.6 Régulation des VGLUTs

Le contrôle du transport de neurotransmetteurs est un facteur important déterminant de la concentration intravésiculaire en neurotransmetteur. Cette concentration possède une influence sur la transmission du signal nerveux.^{190, 197}

$$\Delta\mu\text{H}^+ = F\Delta\psi + RT \ln [\text{H}^+]_v / [\text{H}^+]_c$$

F : Constante de Faraday, R : Constante des gaz parfaits, T : Température absolue, $[\text{H}^+]_v$: Concentration en H^+ intravésiculaire, $[\text{H}^+]_c$: Concentration en H^+ cytoplasmique

Equation III-1 : Equation du gradient électrochimique d'après Omote *et al.*¹²⁹

Les ΔpH et $\Delta\psi$ établis par la V-ATPase sont très dépendants de la concentration en chlorure.^{129, 175, 193, 198} Bien que le ΔpH augmente par la concentration en Cl^- , $\Delta\psi$ est la principale variable du gradient électrochimique de proton $\Delta\mu\text{H}^+$. (**Equation III-1**)

Pour une concentration supérieure à 100 mM de Cl^- , ΔpH est alors la seule composante de $\Delta\mu\text{H}^+$. L'entrée de chlorures dans la vésicule synaptique réduit $\Delta\psi$, impliquant une augmentation de l'activité de la

197. Edwards, R. H. *Neuron*. **2007**, 55, 835-58.

198. Xie, X. S., *et al.* *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 18870-3.

V-ATPase. Cette dernière transporte alors plus de protons à l'intérieur de la vésicule, ce qui a pour effet une augmentation de ΔpH .

De nombreuses études ont été menées afin de déterminer le mécanisme moléculaire de l'entrée des ions chlorures. Différentes pistes ont alors été envisagées, notamment la présence d'un canal CLC-3 chlorure comme régulateur du vésiculaire ΔpH .^{196, 199} Cependant, il a été montré que le canal chlore n'est pas responsable de la dépendance aux ions Cl^- .^{193, 200}

Juge *et al.* ont proposé un modèle de transport de chlorures. Dans ce modèle, l'activité des VGLUTs est régulée par une liaison directe des chlorures aux VGLUTs (**Figure III-4**).¹⁹⁰ La dépendance au Cl^- a été mesurée dans des VGLUTs incorporés à l'intérieur de liposome. Ainsi, la cinétique du transport du glutamate devient dépendante d'un seul composant, activée par quelques millimolaires de chlorure et ne subit aucune inhibition à forte concentration de chlorures. Ce modèle indique donc que l'inhibition du glutamate observée dans les vésicules synaptiques par une forte concentration de Cl^- n'est pas due à une perméabilité aux chlorures des VGLUTs.¹²⁹ Ce modèle a aussi permis de mettre en avant une forte coopération d'activation des Cl^- . Cette coopérativité signifie que l'activité des VGLUTs est strictement régulée. Ainsi, les VGLUTs sont presque inactifs à 2 mM de chlorure, alors qu'une activité maximale est observée à 5 mM. La forte dépendance au Cl^- est une des caractéristiques de la famille des SLC17 incluant VGLUT1, VGLUT3, VNUT, VEAT et NPT1.^{134, 190, 201-203} La régulation par les ions chlorures est spécifique des SLC17 puisqu'elle n'a pas été observée chez les VMATs, membres des SLC18.¹⁹⁰

De façon inattendue, la stimulation des VGLUTs par le Cl^- est inhibée de façon compétitive par des cétoacides, des pyruvates et des acétoacétates.¹⁹⁰ Ces cétoacides étant des intermédiaires métaboliques de la glycolyse, ces résultats montrent bien la relation fonctionnelle qui existe entre la transmission glutamatergique et les états métaboliques. L'inhibition des VGLUTs par ces composés montre pourquoi un régime cétogénique est efficace dans le contrôle de l'épilepsie. De plus, les VGLUTs sont inhibés par les α -cétoacides produits dans la leucine (Maladie du sirop d'érable) et la phénylcétonurie. Ces observations suggèrent alors une relation entre ces maladies génétiques et la signalisation glutamatergique.¹²⁹

III.7 VGLUTs et pathologies

III.7.a Implications des VGLUTs dans diverses pathologies

L'expression des VGLUTs détermine le remplissage des vésicules synaptiques et influence directement les récepteurs du glutamate et la transmission synaptique. Ainsi, les transporteurs vésiculaires sont des acteurs principaux de l'apprentissage et de la mémoire dans le système nerveux central.

En 2011, Cheng *et al.* ont montré que l'expression protéique de VGLUT 1, 2 et 3 chez des souris, présentant une accélération de la sénescence (SAMP8 : senescence-accelerated mouse prone 8), diminue

199. Kawasaki, M., *et al. Neuron*. **1994**, 12, 597-604.

200. Stobrawa, S. M., *et al. Neuron*. **2001**, 29, 185-96.

201. Sawada, K., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2008**, 105, 5683-6.

202. Miyaji, T., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2008**, 105, 11720-4.

203. Iharada, M., *et al. J. Biol. Chem*. **2010**, 285, 26107-13.

de façon « âge-dépendant » dans le cortex de ces souris avec une détérioration de la mémoire et de l'apprentissage.²⁰⁴

Il a été envisagé qu'une diminution de l'expression des VGLUTs est impliquée dans des pathologies neuropsychiatriques utilisant une signalisation glutamatergique.

Des études menées sur des souris, présentant un taux d'expression de VGLUT1 réduit, ont montré que les rongeurs ont une anxiété accrue, des comportements dépressifs ainsi que des troubles de la mémoire.^{183, 205} De plus, les animaux modèles de dépression présentent un taux de VGLUT1 réduit.²⁰⁶

Concernant VGLUT2, il a été montré qu'un niveau d'expression réduit de ce transporteur diminue la dégénération des motoneurons chez les souris SOD1^{G93A}, souris modèles de la sclérose latérale amyotrophique (SLA).²⁰⁷ Les souris VGLUT2 hétérozygotes, quant à elles, présentent une réponse diminuée aux douleurs neuropathiques.¹⁷⁹ De plus, VGLUT2 jouerait un rôle dans le développement de la schizophrénie.²⁰⁸

Les études menées sur une perte de VGLUT3 ont permis de noter que de telles souris présentent une surdité neurosensorielle.¹⁸⁴

Ces informations indiquent alors qu'une diminution de VGLUTs provoque des changements homéostatiques dans différents systèmes glutamatergiques.

III.7.b Implications des VGLUTs dans la maladie d'Alzheimer

Une étude récente, réalisée par Rueda *et al.*, a permis de mettre en avant le fait que des souris possédant des désordres cognitifs ont une quantité de VGLUT1 inférieure à celle observée chez les souris contrôles.²⁰⁹ De plus, ces souris traitées par de la mémantine, un médicament prescrit dans la maladie d'Alzheimer inhibant les récepteurs NMDA (**Paragraphe II.2.a**), présentent un niveau de VGLUT1 augmenté dans l'hippocampe.

Une diminution de VGLUT1 a d'ailleurs pu être confirmée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer car ils présentent une faible immunoréactivité pour ce transporteur.

Kashani *et al.* ont montré qu'une perte de transporteurs vésiculaires du glutamate, VGLUT1 et VGLUT2, dans le cortex préfrontal est corrélée à une baisse des fonctions cognitives dans la maladie d'Alzheimer.²¹⁰ Ces travaux confirment alors qu'une diminution des transporteurs vésiculaires du glutamate 1 et 2 dans les régions du cortex cérébral et de l'hippocampe a une implication dans la diminution de l'apprentissage et de la mémoire dépendant de l'âge. De plus, une corrélation a pu être caractérisée entre diminution de VGLUT1 et score de démence clinique.²¹⁰

Kirvell *et al.* ont pu, dans un premier temps, mettre en évidence une diminution de VGLUT1 dans le cortex pariétal et occipital chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, mais pas dans le cortex

204. Cheng, X. R., *et al. Neurobiol. Learn. Mem.* **2011**, 95, 361-75.

205. Garcia-Garcia, A. L., *et al. Biol. Psychiatry.* **2009**, 66, 275-82.

206. Zink, M., *et al. Neuropharmacology.* **2010**, 58, 465-73.

207. Wootz, H., *et al. Neurobiol. Dis.* **2010**, 37, 58-66.

208. Shen, Y.-C., *et al. Schizophr. Res.* **2010**, 121, 179-186.

209. Rueda, N., *et al. J. Alzheimers Dis.* **2010**, 21, 277-90.

210. Kashani, A., *et al. Neurobiol. Aging.* **2008**, 29, 1619-1630.

211. Kirvell, S. L., *et al. J. Neurochem.* **2006**, 98, 939-50.

frontal.²¹¹ Puis dans un deuxième temps, ils ont établi une corrélation entre le score cognitif et l'expression de VGLUT1. Mais aucune différence n'a pu être observée dans le cortex préfrontal et temporal des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.²¹²

Certaines études immunohistochimiques ont donné des résultats contradictoires concernant l'expression de VGLUT1 et VGLUT2 dans les tissus cérébraux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer décédés. La densité de fibres glutamatergiques dans l'élément pré-synaptique est élevée dans le gyrus préfrontal moyen de patients atteints d'une légère déficience cognitive et cette densité est diminuée chez des patients à des stades moyens et sévères de la maladie d'Alzheimer.²¹³

En revanche, une étude récente menée par Sokolow *et al.* laisserait penser qu'il n'y aurait pas de différence significative d'expression de VGLUT1 et VGLUT2 entre les contrôles et les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.²¹⁴

Ces informations contradictoires concernant une diminution de transporteurs vésiculaires du glutamate dans la maladie d'Alzheimer témoignent de la nécessité de développer des composés spécifiques de ces transporteurs. L'utilisation de telles molécules permettrait ainsi de pouvoir étudier les mécanismes biologiques des VGLUTs dans des conditions normales et pathologiques.

212. Kirvell, S. L., *et al.* *Neurology*. **2010**, 75, 1803-9.

213. Bell, K. F. S., *et al.* *J. Neurosci.* **2007**, 27, 10810-10817.

214. Sokolow, S., *et al.* *Neurobiol. Dis.* **2012**, 45, 381-7.

IV. La maladie d'Alzheimer

IV. La maladie d'Alzheimer

IV.1 Introduction

Aloïs Alzheimer (14 juin 1864 – 19 décembre 1915) était un psychiatre et un neuropathologiste allemand (Figure IV-1).



Figure IV-1 : Aloïs Alzheimer

Le 25 novembre 1901, une femme de 48 ans, Auguste D., est admise à l'hôpital de Francfort (Allemagne). Cette patiente présentait une symptomatologie variée associant une dégradation progressive de ses facultés cognitives : difficultés de mémoire et de compréhension allant jusqu'à l'aphasie, la désorientation, des comportements incohérents et imprévisibles, des hallucinations, des confusions mentales et une inaptitude psychosociale. Suite à la mort de cette patiente en 1906, Aloïs Alzheimer, pratiqua une autopsie de son cerveau. Grâce à l'utilisation de nouvelles techniques de coloration à l'aniline et d'imprégnation argentique, il révéla la présence de plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire.²¹⁵ Cette histopathologie est caractéristique de la maladie d'Alzheimer (MA).

Plus de 35 millions de personnes sont atteintes de cette pathologie à travers le monde dont 5,5 millions aux Etats-Unis. D'après une étude ministérielle réalisée en 2004 (N° 2454 - Rapport sur la maladie d'Alzheimer et les maladies apparentées au nom de l'Office parlementaire d'évaluation des politiques de santé. Rapporteuse : Mme Cécile Gallez), 860 000 personnes seraient touchées par la Maladie d'Alzheimer en France. Les études épidémiologiques estiment que le nombre de patients atteints par cette pathologie serait de 1,3 millions en 2020 et de 2,1 millions en 2040.²¹⁶ De plus, le nombre de nouveaux cas en France est estimé à 225 000 par an.²¹⁶

La maladie d'Alzheimer entraîne des détériorations conduisant à la mort 3 à 9 ans après le diagnostic. Cette maladie est la plus commune des démences et représente 50 à 56 % des cas autopsiés. Le principal facteur de risque de la maladie d'Alzheimer est l'âge. Son incidence double tous les cinq ans après 65 ans, avec le diagnostic de 1275 nouveaux cas par an pour 100 000 personnes.²¹⁷ Avec l'augmentation de l'âge

215. Maurer, K., et al. *Lancet*. **1997**, 349, 1546-9.

216. Helmer, C., et al. *Med. Sci. (Paris)*. **2006**, 22, 288-296.

217. Hirtz, D., et al. *Neurology*. **2007**, 68, 326-37.

des populations, la prévalence aux Etats-Unis devrait approcher 13,2 à 16 millions de malades dans les années 2050.²¹⁸

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par un début progressif de démence avec une atrophie corticale diffuse. L'importance de la démence augmente avec l'âge, soit 36 % des causes de démences chez les 65-74 ans, 64 % chez les 75-84 ans et 96 % chez les 85 ans et plus.

Les symptômes comprennent des pertes de mémoire, des difficultés de jugement, de raisonnement et d'accomplissement des tâches quotidiennes, des changements d'humeur et de comportement. Cette dégradation se fait selon un mode progressif et irréversible. La maladie d'Alzheimer est décrite comme étant l'aggravation des « quatre A » : Amnésie, Apraxie, Aphasie et Agnosie.

Des changements moléculaires ont pu être détectés dans la maladie d'Alzheimer, mais l'une des principales caractéristiques correspond à un mauvais repliement de certaines protéines cérébrales provenant de dommages oxydatifs et inflammatoires qui provoquent des dysfonctionnements synaptiques.²¹⁹

IV.2 Protéines anormales dans la maladie d'Alzheimer

La pathologie de la maladie d'Alzheimer est principalement due à l'augmentation cérébrale du peptide β -amyloïde chez les patients atteints et constitue « l'hypothèse amyloïde ». Les plaques séniles constituées du peptide β -amyloïde ($A\beta$) et de neurites dystrophiques dans les terminaisons du néocortex ainsi que la dégénérescence neurofibrillaire du lobe temporal constituent les caractéristiques principales de la maladie d'Alzheimer.

IV.2.a Le peptide β -amyloïde

Le peptide β -amyloïde provient de la protéolyse du précurseur de la protéine β -amyloïde (APP) par action enzymatique séquentielle de BACE1 (beta-site amyloid precursor protein clearing enzyme 1), de la β -sécrétase, de la γ -sécrétase et d'un complexe protéique faisant intervenir la préséniline 1 (**Figure IV-2**).²²⁰ Un déséquilibre entre production et clairance, et l'agrégation de peptides provoquent l'accumulation d' $A\beta$. Un excès d' $A\beta$ pourrait être un facteur initiateur de la maladie d'Alzheimer.²¹⁸

218. Hebert, L. E., *et al. Arch. Neurol.* **2003**, 60, 1119-22.

219. Querfurth, H. W., *et al. New Engl. J. Med.* **2010**, 362, 329-44.

220. Haass, C., *et al. Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 101-12.

Le clivage par la γ -sécrétase de la séquence du peptide β -amyloïde ($A\beta$) initie la voie non-amyloïdogénique. Un large domaine de la protéine précurseur amyloïde est relargué, laissant un fragment carboxy-terminal de 83 résidus (C83). Ce fragment est ensuite dégradé par la γ -sécrétase qui libère à son tour un fragment extracellulaire p3 ainsi que le domaine intracellulaire amyloïde (AICD).

La voie amyloïdogénique est initiée par l'action de BACE-1 sur l'APP conduisant à la formation d'un court précurseur sAPP β . Le fragment C99, substrat de la γ -sécrétase, génère l' $A\beta$ et l'AICD. Le clivage par la γ -sécrétase se produit à l'intérieur de la membrane cellulaire via un processus unique appelé : « protéolyse intramembranaire régulée ». sAPP α et sAPP β sont des fragments sécrétés à partir de l'APP après clivages respectifs de l' α -sécrétase et de la β -sécrétase. L'AICD constitué d'environ 50 aminoacides est relargué dans le cytoplasme après clivages progressifs par la γ -sécrétase. Ainsi, cet AICD est adressé au noyau où il active la transcription du signal.

Figure IV-2 : Formation du peptide $A\beta$ par clivage de l'APP d'après Querfurth *et al.*²¹⁹

Cette théorie de « l'hypothèse amyloïde » est fondée sur l'étude des formes génétiques de la maladie d'Alzheimer, incluant le syndrome de Down et le fait que le peptide $A\beta_{42}$ est toxique.²²¹⁻²²³

Les peptides $A\beta$ s'auto-agrègent spontanément en différentes formes. Une de ces formes est un oligomère constitué de 2 à 6 peptides (**Figure IV-2**).^{224, 225} Ainsi, le peptide β -amyloïde peut croître dans les fibrilles qui s'organisent en feuillet β pour former des fibres insolubles : les plaques amyloïdes.

Les oligomères et les intermédiaires amyloïdes sont d'ailleurs les formes les plus neurotoxiques de l' $A\beta$, même s'il a pu être remarqué que les dimères ou trimères d' $A\beta$ sont toxiques pour les neurones.²²⁶⁻²²⁸

221. Selkoe, D. J. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741-766.
222. Busciglio, J., *et al. Neuron.* **2002**, 33, 677-88.
223. Tanzi, R. E., *et al. Cell.* **2005**, 120, 545-55.
224. Klein, W. L., *et al. Trends Neurosci.* **2001**, 24, 219-24.
225. Kaye, R., *et al. Science.* **2003**, 300, 486-9.
226. Walsh, D. M., *et al. J. Neurosci.* **2005**, 25, 2455-2462.
227. Walsh, D. M., *et al. J. Neurochem.* **2007**, 101, 1172-84.
228. Klyubin, I., *et al. J. Neurosci.* **2008**, 28, 4231-7.

Il est important de noter que la sévérité des troubles cognitifs est corrélée à la quantité d'oligomères présents dans le cerveau.²²⁹ Cependant, lors de l'activation des neurones par un potentiel d'action, il y a augmentation rapide de la sécrétion d'A β au niveau synaptique. Il a d'ailleurs été envisagé que cette sécrétion d'A β tendrait à freiner la transmission nerveuse excitatrice et ainsi contrôler l'hyperactivité neuronale.²³⁰

Le taux normal d'A β est régulé par deux enzymes :

- la néprilysine, une endopeptidase à zinc,
- l'enzyme de dégradation de l'insuline, l'IDE.

La néprilysine dégrade les monomères et les oligomères d'A β .²³¹ Farris *et al.* ont montré que des souris délétères en IDE dégradent deux fois moins de monomères d'A β réduite que les souris de phénotype sauvage.²³²

A *contrario*, une surexpression de néprilysine et d'IDE empêche la formation de plaques séniles.²¹⁹ L'expression de la protéine de néprilysine a été rapportée comme diminuant avec l'âge.^{233, 234} Ce processus est peut-être imputable aux dommages oxydatifs. En effet, une augmentation des dommages oxydatifs de la néprilysine a pu être caractérisée chez des patients atteints de la MA.²³⁵ D'autres études ont montré que l'activité de la néprilysine augmente avec l'âge dans le cerveau sain ainsi que dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer bien qu'une étude récente montre une baisse de cette enzyme corrélée avec l'âge des sujets atteints de la MA.²³⁶⁻²³⁹

IV.2.b La protéine Tau

Les enchevêtrements neurofibrillaires, qui sont des inclusions filamenteuses dans les neurones pyramidaux, sont impliqués dans la maladie d'Alzheimer et dans d'autres maladies neurodégénératives appelées taupathies.²⁴⁰ Le nombre de ces enchevêtrements neurofibrillaires est un marqueur de la sévérité de la MA. La principale composante de ces enchevêtrements provient de l'hyperphosphorylation anormale et de l'agrégation de la protéine tau. Cette dernière, en condition physiologique, est une protéine soluble présente en quantité importante dans les axones qui permet l'assemblage et la stabilité des microtubules et des vésicules de transport.

-
229. Lue, L. F., *et al. Am. J. Pathol.* **1999**, 155, 853-62.
230. Kamenetz, F., *et al. Neuron.* **2003**, 37, 925-37.
231. Kanemitsu, H., *et al. Neurosci. Lett.* **2003**, 350, 113-6.
232. Farris, W., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, 100, 4162-7.
233. Russo, R., *et al. FEBS Lett.* **2005**, 579, 6027-30.
234. Hellstrom-Lindahl, E., *et al. Neurobiol. Aging.* **2008**, 29, 210-21.
235. Wang, D. S., *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 310, 236-241.
236. Miners, J. S., *et al. J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2009**, 68, 902-14.
237. Miners, J. S., *et al. Brain Pathol.* **2010**, 20, 794-802.
238. Miners, J. S., *et al. J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, 70, 944-59.
239. Proctor, C. J., *et al. Mol. Neurodegener.* **2012**, 7, 32.
240. Lee, V. M., *et al. Annual Rev. Neurosci.* **2001**, 24, 1121-59.

La protéine tau hyperphosphorylée, quant à elle, est insoluble. Elle perd alors son affinité pour les microtubules et s'associe en double hélice (**Figure IV-3**). La phosphorylation de tau est régulée par des kinases et des phosphatases.²⁴¹

De la même manière que pour les oligomères d'A β , les agrégats de tau sont cytotoxiques et impliquent des troubles cognitifs.²⁴²⁻²⁴⁴ Pourtant, la diminution du transport axonal et même du nombre de neurones est indépendante de la progression des enchevêtrements neurofibrillaires.²⁴⁵ En effet, ces filaments en hélice piègent les espèces intermédiaires toxiques de tau jouant alors un rôle de neuroprotecteur.²⁴⁶

Contrairement aux cerveaux Parkinsoniens, où 30 mutations de la protéine tau sur le chromosome 17 ont pu être caractérisées dans la zone fronto-temporale, aucune mutation n'a été découverte dans les cerveaux de souris atteintes par la maladie d'Alzheimer.²⁴⁷

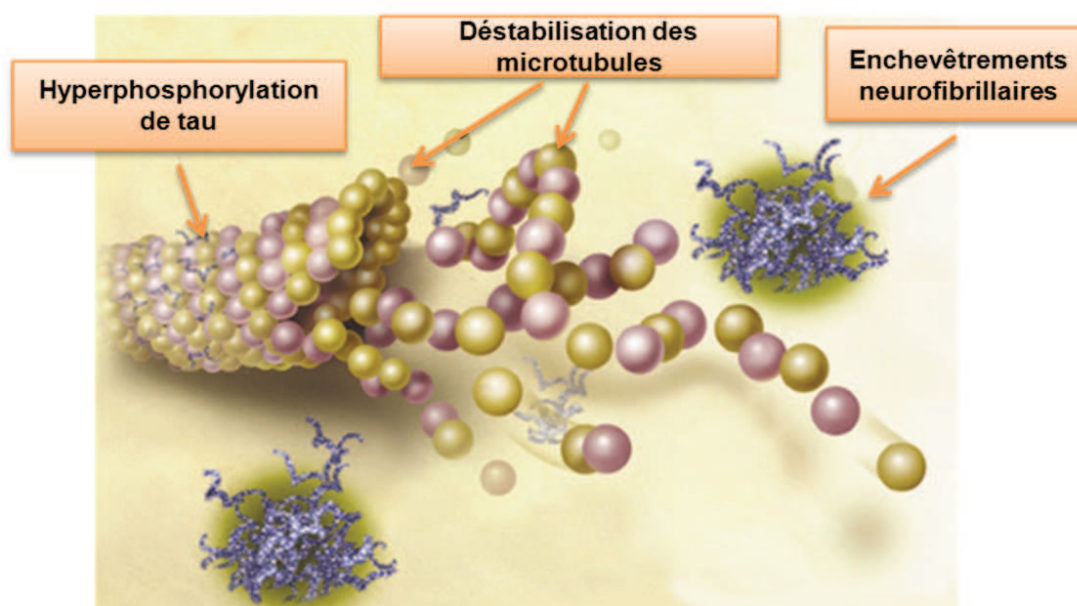


Figure IV-3 : Formation d'enchevêtrements neurofibrillaires par hyperphosphorylation de tau

Outre le fait que la perte neuronale soit indépendante de la progression des enchevêtrements neurofibrillaires, elle est aussi indépendante de la qualité de ces derniers.²⁴⁸ Toutefois, Wallin *et al.* ont pu établir une corrélation entre la baisse du score observée lors des examens cognitifs et l'accumulation de la protéine tau phosphorylée ainsi que de la protéine tau totale.²⁴⁹

241. Iqbal, K., *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1739, 198-210.
242. Santacruz, K., *et al. Science.* **2005**, 309, 476-481.
243. Khlistunova, I., *et al. J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 1205-1214.
244. Oddo, S., *et al. J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 39413-39423.
245. Andorfer, C., *et al. J. Neurochem.* **2003**, 86, 582-590.
246. Lee, H. G., *et al. Trends Mol. Med.* **2005**, 11, 164-169.
247. Goedert, M., *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1739, 240-250.
248. Gomez-Isla, T., *et al. Ann. Neurol.* **1997**, 41, 17-24.
249. Wallin, A. K., *et al. Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2006**, 21, 131-138.

Des constats expérimentaux ont permis de montrer que l'accumulation d'A β se réalise prématurément et entraîne l'agrégation de tau.²⁵⁰⁻²⁵² De plus, l'observation de l'accumulation du peptide A β induite par des cultures cellulaires de rats rendus Alzheimer montre la nécessité de la présence de la protéine tau endogène.^{253, 254}

Ainsi, l'accumulation d'amyloïde et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer est accélérée par l'augmentation du stress oxydant, le mauvais repliement protéique, une déficience du protéasome ainsi qu'une défaillance de la fonction autophagocytose permettant d'éliminer les protéines anormales, le tout étant corrélé avec l'âge.^{255, 256}

IV.3 Implication de la synapse dans la maladie d'Alzheimer

IV.3.a Défaillances synaptiques

En 2002, Selkoe *et al.* ont décrit la maladie d'Alzheimer comme provenant de défaillances synaptiques. Il a pu être remarqué que les synapses de l'hippocampe commencent à diminuer chez les patients atteints d'une légère défaillance cognitive.^{257, 258} Chez les patients atteints d'une forme modérée de la MA, il y a une diminution d'environ 25 % de la protéine synaptophorine dans les vésicules synaptiques.²⁵⁹ De plus, avec l'aggravation de la maladie, il y a une perte importante de synapses qui n'est d'ailleurs pas corrélée avec la perte des neurones. En revanche, cette perte de synapses est corrélée avec l'augmentation de la démence.^{260, 261, 262}

Cependant, il est à mettre en parallèle le fait qu'une perte synaptique est provoquée par le vieillissement et plus particulièrement dans le gyrus denté de l'hippocampe.^{263, 264}

La perte de synapses a pour principal effet une perturbation des molécules de signalisation. Ces perturbations peuvent avoir lieu soit au niveau pré-synaptique, lors du relargage des neurotransmetteurs, soit au niveau post-synaptique en perturbant les récepteurs du glutamate.^{265, 266} La perturbation des récepteurs post-synaptiques est principalement imputable à l'endocytose d'une partie des récepteurs NMDA.²⁶⁷ Ainsi, cette perte de récepteurs affaiblit l'activité synaptique. Un changement similaire de

- 250. Gotz, J., *et al. Science*. **2001**, 293, 1491-1495.
- 251. Lewis, J., *et al. Science*. **2001**, 293, 1487-1491.
- 252. Oddo, S., *et al. Neuron*. **2003**, 39, 409-421.
- 253. Rapoport, M., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2002**, 99, 6364-6369.
- 254. Roberson, E. D., *et al. Science*. **2007**, 316, 750-754.
- 255. Lopez Salas, M., *et al. J. Neurosci. Res*. **2000**, 62, 302-310.
- 256. Hoozemans, J. J., *et al. Acta Neuropathol*. **2005**, 110, 165-172.
- 257. Selkoe, D. J. *Science*. **2002**, 298, 789-791.
- 258. Scheff, S. W., *et al. Neurology*. **2007**, 68, 1501-1508.
- 259. Masliah, E., *et al. Neurology*. **2001**, 56, 127-129.
- 260. Davies, C. A., *et al. J. Neurol. Sci*. **1987**, 78, 151-164.
- 261. Dekosky, S. T., *et al. Ann. Neurol*. **1990**, 27, 457-464.
- 262. Terry, R. D., *et al. Ann. Neurol*. **1991**, 30, 572-580.
- 263. Masliah, E., *et al. J. Alzheimers Dis*. **2006**, 9, 91-99.
- 264. Lister, J. P., *et al. Arch. Neurol*. **2009**, 66, 829-833.
- 265. Chapman, P. F., *et al. Nature Neurosci*. **1999**, 2, 271-276.
- 266. Shankar, G. M., *et al. J. Neurosci*. **2007**, 27, 2866-2875.
- 267. Snyder, E. M., *et al. Nature Neurosci*. **2005**, 8, 1051-1058.

l'équilibre entre potentialisation et dépression se produit au niveau des synapses lors du vieillissement physiologique. Il est important de noter que l'accumulation interneuronale d'A β peut déclencher prématurément ces phénomènes de déficits synaptiques.²⁶⁸

IV.3.b Implications des neurotrophines et des récepteurs à acétylcholine

Les neurotrophines (NTs) forment une famille de polypeptides qui sont des facteurs essentiels pour la prolifération, la différenciation, ainsi que pour la survie des neurones et des cellules gliales. Ils sont aussi impliqués dans les processus de mémoire, d'apprentissage et de comportement.²¹⁹

Ainsi, le niveau des récepteurs neurotrophines est normalement élevé dans les neurones cholinergiques du prosencéphale. A des stades avancés de la maladie d'Alzheimer, il a pu être noté que ce niveau d'expression est largement réduit. De plus, l'injection de facteurs de croissance neuronale (NGF : Nerve Growth Factor) chez des souris rendues Alzheimer a permis de sauver certaines populations de neurones et a conduit à des améliorations cognitives et du métabolisme cérébral.^{269, 270} Il a aussi été montré que pour certaines pathologies neurodégénératives, telle que la maladie d'Alzheimer, le niveau en facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor) est largement diminué et cette diminution a été reproduite expérimentalement avec des oligomères d'A β ₄₂.^{271, 272}

Une diminution des neurones cholinergiques a pu être corrélée avec l'accumulation du peptide A β et de tau.²¹⁹ Ainsi, il a été montré que le récepteur α -7 nicotinique pré-synaptique de l'acétylcholine (α 7-nAChR), impliqué dans certains processus cognitifs, voit son niveau d'expression augmenter avec les premiers stades de la MA, puis largement diminuer avec l'évolution de la maladie.^{273, 274}

D'un point de vue mécanistique, l'A β se lierait à l' α 7-nAChR empêchant ainsi le relargage de l'acétylcholine et provoquerait une activation de la potentialisation à long terme.²⁷⁵

Les récepteurs muscariniques à acétylcholine présentent, eux aussi, un niveau d'expression réduit chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.²⁷⁶ L'activation de ces récepteurs muscariniques à acétylcholine, tels que les récepteurs muscariniques de type 1 (M1), limite la phosphorylation de tau.^{277, 278} De ce fait, des inhibiteurs de cholinestérase amélioreraient la neurotransmission. Ainsi, des modulateurs de l' α 7-nAChR ont été développés et les études cliniques menées sur des agonistes sélectifs de M1 ont montré des améliorations significatives de la cognition et une amélioration de la quantité d'A β dans le liquide cérébro-spinal. Néanmoins ces composés ne pourront être utilisés en thérapeutique à cause de leur toxicité.^{279, 280}

268. Mucke, L., *et al. J. Neurosci.* **2000**, 20, 4050-4058.
269. Cooper, J. D., *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2001**, 98, 10439-44.
270. Tuszynski, M. H. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2007**, 21, 179-189.
271. Connor, B., *et al. Brain Res. Mol. Brain Res.* **1997**, 49, 71-81.
272. Garzon, D. J., *et al. J. Neurosci.* **2007**, 27, 2628-2635.
274. Ikonomic, M. D., *et al. Arch. Neurol.* **2009**, 66, 646-651.
273. Maelicke, A., *et al. Biol. Psychiatry.* **2001**, 49, 279-288.
275. Wang, H. Y., *et al. J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 5626-5632.
276. Nitsch, R. M. *Neurodegeneration.* **1996**, 5, 477-482.
277. Caccamo, A., *et al. Neuron.* **2006**, 49, 671-682.
278. Bitner, R. S., *et al. Brain Res.* **2009**, 1265, 65-74.
279. Bodick, N. C., *et al. Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1997**, 11 Suppl 4, S16-22.
280. Nitsch, R. M., *et al. Ann. Neurol.* **2000**, 48, 913-918.

IV.4 Le système glutamatergique dans la maladie d'Alzheimer

IV.4.a Implications des transporteurs du glutamate

De nombreuses déficiences du système glutamatergique sont impliquées dans la maladie d'Alzheimer, notamment l'augmentation de la concentration du glutamate dans les synapses. Comme il a été précédemment décrit (**Paragraphe III.7.b**), une diminution de VGLUT1 et de VGLUT2 a pu être observée dans les cortex préfrontaux de patients atteints de la MA, avec une baisse plus importante de VGLUT1 par rapport à VGLUT2.^{210, 211} Plus récemment, en utilisant des fractions enrichies en synaptosomes, Sokolow *et al.*, ont également montré une diminution de VGLUT1 et 2 dans le cortex pariétal de malades d'Alzheimer, mais ils n'ont pu atteindre des niveaux expérimentaux significatifs à cause des régions cérébrales examinées et au faible nombre de cortex étudiés.²¹⁴ Cependant, cette étude indique que le peptide β -amyloïde s'accumule plus dans les terminaisons exprimant VGLUT1/2 que celles n'ayant pas de transporteurs vésiculaires du glutamate. Ces informations suggèrent que l'A β se situe préférentiellement au niveau des terminaisons pré-synaptiques des neurones glutamatergiques dans le cortex des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.²¹⁴

L'expression des gènes et le niveau protéique des EAAT1 et EAAT2 ont aussi été décrits comme étant réduits dans le cortex et l'hippocampe des cerveaux atteints de la MA suggérant que l'élimination du glutamate depuis la fente synaptique est atténuée.²⁸¹⁻²⁸³ Des variations d'expression des transporteurs vésiculaires du glutamate ont pu être identifiées à des stades précoces de la maladie d'Alzheimer.²⁸¹ Le transport du glutamate diminuant, l'activité de la glutamate synthétase est ralentie et limite alors le retour du glutamate au niveau de l'élément pré-synaptique engendrant une concentration élevée de ce neurotransmetteur dans les astrocytes.²⁸⁴ Une quantité élevée de glutamate peut conduire à un retour du neurotransmetteur au niveau de la fente synaptique lors d'une dépolarisation trop importante, processus se produisant dans la MA.^{285, 286}

Ainsi, l'ensemble de ces dysfonctionnements, que ce soit de transport de glutamate ou de conversion en glutamine, engendrent la mort neuronale à cause de l'effet neurotoxique liée à l'accumulation de ce neurotransmetteur. Cette mort cellulaire est due à l'augmentation de la réponse induite par les récepteurs NMDA qui provoquent une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} .^{287, 288} L'augmentation de calcium active alors différentes voies cellulaires comme les calpaïnes, le relargage d'espèces réactives de l'oxygène et une dépolarisation des membranes mitochondriales.²⁸⁹ Tous ces processus conduisent à une réduction du métabolisme énergétique des cellules et une libération du cytochrome C.²⁹⁰

281. Masliah, E., *et al.* *Ibid.* **1996**, 40, 759-766.

282. Jacob, C. P., *et al.* *J. Alzheimers Dis.* **2007**, 11, 97-116.

283. Scott, H. A., *et al.* *Neurobiol. Aging.* **2011**, 32, 553 e1-11.

284. Robinson, S. R. *J. Neurosci. Res.* **2001**, 66, 972-980.

285. Parihar, M. S., *et al.* *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2007**, 292, C8-23.

286. Matos, M., *et al.* *Neuroscience.* **2008**, 156, 898-910.

287. Greenamyre, J. T., *et al.* *Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psych.* **1988**, 12, 421-430.

288. Dong, X. X., *et al.* *Acta Pharmacol. Sin.* **2009**, 30, 379-387.

289. Vosler, P. S., *et al.* *Mol. Neurobiol.* **2008**, 38, 78-100.

290. Alberdi, E., *et al.* *Cell calcium.* **2010**, 47, 264-272.

Ainsi, la mort cellulaire s'exécute par voie apoptotique et nécrotique.²⁸⁸

IV.4.b Implications des récepteurs du glutamate

Concernant les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs), le peu d'informations disponibles sur leur niveau d'expression ne permet pas de pouvoir tirer des conclusions.

Plusieurs études ont rapporté une augmentation de la liaison du glutamate aux récepteurs NMDA au niveau du striatum des patients atteints de la MA, alors qu'aucun changement d'expression des récepteurs NMDA n'a pu être caractérisé dans les différentes régions cérébrales des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer.^{291, 292}

En revanche, il a été montré qu'il existe une diminution des niveaux protéiques et des ARNm de ces récepteurs à des stades avancés de la maladie.²⁹³⁻²⁹⁶ Les écarts constatés entre ces résultats pourraient s'expliquer par les différences entre les stades de la maladie. L'autoradiographie a permis de caractériser la diminution des sites de liaisons des récepteurs NMDA dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. Cette idée conforte l'hypothèse stipulant que certaines régions cérébrales sont moins riches en récepteur NMDA.

Des études immunohistochimiques ont permis de mettre en avant le fait qu'il y a une variation d'expression des récepteurs AMPA. Ainsi, il y a augmentation de GluR1 et GluR2/3 dans le néocortex de patients atteints de troubles cognitifs légers, suivie d'une diminution de l'expression dans les premiers stades de la maladie d'Alzheimer, et de nouveau une augmentation de GluR2/3 dans les cas les plus sévères. Une étude, réalisée par Williams *et al.*, a permis de montrer une augmentation de l'ARNm codant pour GluR2 chez les patients atteints de la MA.²⁹⁷ Dans cette maladie, une diminution des récepteurs AMPA serait corrélée avec les zones cérébrales atteintes, mais il existe de nombreuses variations physiologiques de la quantité de ces récepteurs en fonction des différents patients.^{298, 299} Ainsi, il a été montré que la perte de GluR1 et GluR2/3 est limitée au subiculum et à la couche CA1 de l'hippocampe.^{298, 299} Ces localisations indiquent alors que les variations de quantité de récepteurs AMPA sont très spécifiques de certaines régions cérébrales.

Contrairement aux iGluRs, les récepteurs kaïnates (KA) ont été peu étudiés. Même s'il ne semble pas qu'il y ait de changement de l'expression de ces récepteurs dans la maladie d'Alzheimer, une diminution de liaison aux KA a pu être mise en évidence par autoradiographie au niveau de l'hippocampe de patients atteints.³⁰⁰

291. Ulas, J., *et al. J. Neurosci.* **1994**, 14, 6317-6324.
292. Ikonomic, M. D., *et al. Exp. Neurol.* **1999**, 160, 194-204.
293. Sze, C., *et al. J. Neurol. Sci.* **2001**, 182, 151-159.
294. Hynd, M. R., *et al. J. Neurochem.* **2004**, 89, 240-247.
295. Hynd, M. R., *et al. J. Neurochem.* **2004**, 90, 913-919.
296. Panegyres, P. K., *et al. J. Neurol.* **1999**, 246, 369-370.
297. Williams, C., *et al. PloS one.* **2009**, 4, 4936.
298. Pellegrini-Giampietro, D. E., *et al. Neuroscience.* **1994**, 61, 41-9.
299. Yasuda, R. P., *et al. Brain Res.* **1995**, 678, 161-167.
300. Dewar, D., *et al. Brain Res.* **1991**, 553, 58-64.

Tableau IV-1 : Altérations du système glutamatergique et leur localisation cérébrale dans la maladie d'Alzheimer d'après Revett *et al.*³⁰¹

| Composants du système glutamatergique | Altérations cérébrales |
|---------------------------------------|---|
| VGLUT1 | Diminution de l'expression protéique avant la perte cellulaire et le début de la pathologie |
| VGLUT2 | Diminution de l'expression protéique avant la perte cellulaire et le début de la pathologie |
| GLAST/EAAT1 | Diminution des protéines dans les premiers stades cliniques |
| GLT-1/EAAT2 | Diminution de l'expression protéique dans les premiers stades cliniques |
| Glutamine synthase | Diminution de l'expression protéique |
| Récepteurs NMDA | Augmentation de l'expression protéique pour des stades de déficience cognitive légère |
| NR1 | Diminution de l'expression protéique |
| NR2A-B | Diminution de l'expression protéique |
| NR2C-D | Non affecté |
| NR3 | Non testé |
| iGLUR1-3 | Résultats variables indiquant une augmentation à des stades précoces puis une diminution de GluR1 et une augmentation de GluR2/3 à des stades avancés |
| iGLUR4 | Non testé |
| iGLUR5-7 | Diminution de l'expression |
| Récepteurs kaïnate | Diminution de la liaison au récepteur |
| mGluR1 | Diminution de l'expression protéique |
| mGluR2 | Augmentation de l'expression protéique |
| mGluR3-7 | Non testé |

Abréviations :

AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique,
mGluR : Récepteurs métabotropiques du glutamate,
NMDA : N-méthyl-D-aspartate.

En ce qui concerne les mGluRs, une diminution générale de ces récepteurs a pu être caractérisée dans le cortex et l'hippocampe de cerveaux pathologiques.³⁰⁰ Le niveau de mGluR1 est diminué dans les régions CA1 et le subiculum de l'hippocampe. En revanche, aucune diminution n'a été caractérisée dans les autres régions de l'hippocampe, notamment la région CA3 qui est très impactée par la MA.^{300, 302} Une augmentation de mGluR2 a, quant à elle, été montrée au niveau de l'hippocampe qui est corrélée avec l'hyperphosphorylation de la protéine tau.^{300, 303}

301. Revett, T. J., *et al.* *J. Psychiatry Neurosci.* **2012**, 37, in press.

302. Aronica, E., *et al.* *Neuroscience.* **1998**, 82, 979–991.

303. Lee, H. G., *et al.* *Acta Neuropathol.* **2004**, 107, 365-71.

Ces études permettent de penser que l'altération de l'expression des mGluRs est impliquée dans la pathologie de la maladie d'Alzheimer (**Tableau IV-1**).

IV.5 Les différentes voies thérapeutiques de la maladie d'Alzheimer

IV.5.a Les antagonistes du glutamate

IV.5.a.i MK-801, phéncyclidine, amantadine et dextrométhorphan

De par le rôle que joue le glutamate dans la régulation du peptide β -amyloïde et de la protéine tau dans la maladie d'Alzheimer, des antagonistes des récepteurs du glutamate ont été considérés comme de bons agents thérapeutiques pendant de nombreuses années.

Tout d'abord, des antagonistes non compétitifs des récepteurs NMDA, tels que le MK-801 (dizocilpine) ou la phéncyclidine ont été utilisés en thérapeutique (**Figure IV-4**).^{304, 305}

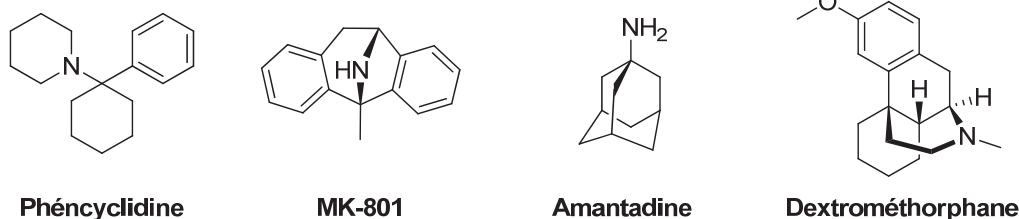


Figure IV-4 : Structures d'antagonistes des récepteurs du glutamate

Ces composés se lient sur les récepteurs NMDA, bloquent de façon lente et irréversible l'entrée de Ca^{2+} dans le pore. En outre, ces composés provoquant de nombreux effets secondaires telles que : des hallucinations, des pertes de mémoire et une ataxie. Ces molécules ne peuvent donc pas être utilisées comme agents thérapeutiques dans la maladie d'Alzheimer puisqu'elles influent sur les récepteurs NMDA, eux-mêmes impliqués dans de nombreux processus biologiques.^{304, 306}

Des antagonistes des récepteurs NMDA ont par la suite été développés. L'amantadine et le dextrométhorphan ont donné des résultats prometteurs pour le traitement de la démence, mais ils ne se sont pas avérés être de bons candidats médicaments contre la maladie d'Alzheimer (**Figure IV-4**).^{306, 307}

IV.5.a.ii La mémantine

La mémantine, un dérivé de l'amantadine synthétisée par Eli Lilly en 1968, est un antagoniste non compétitif qui possède une affinité modérée pour les récepteurs NMDA (**Figure IV-5**).

304. Kornhuber, J., *et al. Biol. Psychiatry.* **1997**, 41, 135-144.
 305. Doraiswamy, P. M. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2003**, 3, 373-378.
 306. Farlow, M. R. *Geriatrics.* **2004**, 59, 22-27.
 307. Sonkusare, S. K., *et al. Pharmacol. Res.* **2005**, 51, 1-17.



Mémantine

Figure IV-5 : Structure de la mémantine

Cette molécule agit en empêchant l'activation pathologique de ces récepteurs mais sans affecter l'activation physiologique.³⁰⁷⁻³¹⁰

Il a été montré que la mémantine bloque l'activité des récepteurs NMDA exclusivement lorsque le canal est ouvert. Étant donné que les canaux des récepteurs NMDA ne s'ouvrent que quelques millisecondes pendant l'activité normale, la mémantine est alors incapable de s'accumuler dans le canal. Ainsi, la mémantine n'agit pas lors de l'activité synaptique physiologique. En revanche, lors d'une activité prolongée ou dans les cas d'une excitotoxicité lorsque les canaux des récepteurs NMDA, la mémantine s'accumule et se comporte comme un antagoniste efficace de l'activité des récepteurs NMDA.^{308, 309, 311, 312}

Les propriétés pharmacocinétiques et de protection des neurones ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*, suggérant que ce composé est bien toléré dans le traitement de maladies neurodégénératives. Ainsi, au regard des résultats obtenus lors des essais cliniques sur l'homme, l'Union Européenne et l'U.S.F.D.A. (United States Food and Drug Administration) ont autorisé respectivement en 2002 et 2003, la mise sur le marché de la mémantine pour le traitement des stades modérés à sévères de la maladie d'Alzheimer.^{308, 310, 311}

IV.5.a.iii Mécanisme d'action de la mémantine

L'accumulation de la mémantine protège de nombreux agents toxiques, tels que les acides quinoliques, des traumatismes crâniens, des ischémies cérébrales et de la neurotoxicité des peptides amyloïdes β 1-40/ β 1-42. Cet effet neuroprotecteur a pu être mis en évidence *in vitro* et *in vivo*.³¹³⁻³¹⁶ Song *et al.* ont montré que la mémantine protège les neurones corticaux de la toxicité de l'amyloïde β 1-42 en diminuant l'activation des protéines kinases de tau tels que GSK-3 β et ERK-1/2 et la phosphorylation de la protéine tau.³¹⁷ En fait, ce médicament diminue le clivage induit par l'A β de la caspase-3 et de la déphosphorylation de l'AMPc, deux processus impliqués dans la survie cellulaire. Cependant, la mémantine ne modifie ni la conformation ni l'internalisation de l'A β et est incapable de diminuer la concentration du glutamate dans la fente

311. Parsons, C. G., *et al. Methods Mol. Biol.* **2007**, 403, 15-36.
308. Lipton, S. A., *et al. Expert Opin. Ther. Targets.* **2005**, 9, 427-429.
309. Wenk, G. L., *et al. Behav. Pharmacol.* **2006**, 17, 411-424.
310. Herrmann, N., *et al. Expert Opin. Pharmacother.* **2011**, 12, 787-800.
312. Danysz, W., *et al. Br. J. Pharmacol.* **2012**, 167, 324-352.
313. Tremblay, R., *et al. J. Neurosci.* **2000**, 20, 7183-7192.
314. Rao, V. L., *et al. Brain Res.* **2001**, 911, 96-100.
315. Miguel-Hidalgo, J. J., *et al. Brain Res.* **2002**, 958, 210-221.
316. Floden, A. M., *et al. J. Neurosci.* **2005**, 25, 2566-2575.
317. Song, M. S., *et al. Eur. J. Neurosci.* **2008**, 28, 1989-2002.

synaptique provoquée par l'accumulation de l'A β .³¹⁷ De plus, cet antagoniste a été décrit comme capable d'inverser le phénomène de potentialisation à long terme provoqué par l'A β dans la zone CA1 de l'hippocampe de souris.³¹⁸

De nombreuses études ont révélé les effets bénéfiques de la mémantine sur les déficits cognitifs dans la maladie d'Alzheimer chez des souris transgéniques surexprimant les peptides β -amyloïde.³¹⁹⁻³²¹ Ainsi, des souris transgéniques traitées par une dose de 30 mg/kg de mémantine pendant trois mois montrent une augmentation des performances cognitives sur trois groupes d'âges différents. De plus, cette augmentation s'accompagne d'une diminution de l'hyperphosphorylation de tau et du niveau de GSK-3 β inactive.³²¹ Les souris transgéniques présentent une quantité d'A β insoluble diminuée et une quantité d'A β soluble augmentée. Il n'y a aucune altération du précurseur du peptide amyloïde (APP). Ainsi, l'antagoniste ne modifie pas le précurseur de la protéine amyloïde mais influence l'agrégation ou l'élimination de l'A β chez les animaux modèles de la MA.³¹⁸ La mémantine est donc un médicament capable d'atténuer les effets de cette pathologie sur l'A β et la protéine tau, en augmentant les performances cognitives des animaux modèles, prouvant ainsi le potentiel thérapeutique de cette molécule dans le traitement de la maladie d'Alzheimer. Le mécanisme d'action de la mémantine sur les récepteurs NMDA étant différent de celui des inhibiteurs de cholinestérase (donépézil, galatamine et revastigmine) suggère le potentiel thérapeutique de la combinaison de ces deux médicaments.³⁰¹

La deuxième génération d'analogues de mémantine a été développée. Les nitromémantines auraient un effet neuroprotecteur plus important que la mémantine à des doses moins élevées que ce soit *in vitro* ou *in vivo* sur des animaux modèles.³²² L'action de ces nouveaux composés ne se limite pas au blocage des récepteurs NMDA, comme la mémantine, mais ils nitrosylent les résidus cystéines 1 à 5 du récepteur. Depuis que la nitrosylation de la sous-unité NR2A a été rapportée comme modulant l'activité des récepteurs NMDA, les nitromémantines pourraient être un moyen de cibler plus spécifiquement les récepteurs NMDA sans provoquer d'effets secondaires importants comme la diminution de la pression sanguine observée avec les nitroglycérines, un autre médicament nitrosylant.³⁰⁸ Cependant, de nombreuses études sont encore nécessaires pour démontrer l'efficacité des nitromémantines ainsi que leur évaluation clinique pour une utilisation en thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer.

IV.5.b Les inhibiteurs d'acétylcholinestérase

L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur impliqué dans la mémoire et l'apprentissage au niveau du système nerveux central.

Depuis la mise sur le marché du premier inhibiteur d'acétylcholinestérase (AChEI) dans les années 1990, les médecins considèrent que les médicaments cholinergiques tels que le donépézil, la galantamine et la rivastigmine sont les premières voies de pharmacothérapie de la maladie d'Alzheimer (**Figure IV-6**).

318. Rammes, G., *et al. Neuropharmacology*. **2011**, 60, 982-990.

319. Minkeviciene, R., *et al. J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 311, 677-682.

320. Van Dam, D., *et al. Eur. Neuropsychopharmacol.* **2006**, 16, 59-69.

321. Martinez-Coria, H., *et al. Am. J. Pathol.* **2010**, 176, 870-880.

322. Lipton, S. A. *Nature Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 803-808.

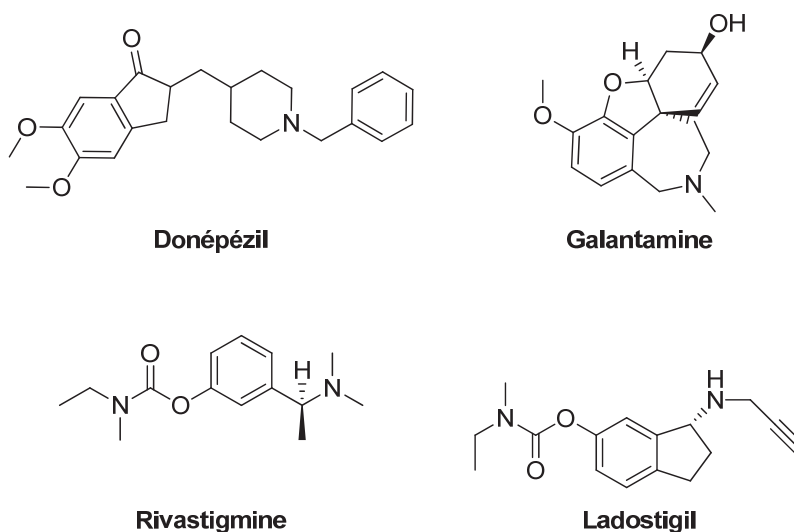


Figure IV-6 : Structures de certains inhibiteurs d'acétylcholinestérase

Bien que ces médicaments possèdent des propriétés pharmacologiques différentes, ils inhibent tous l'acétylcholinestérase. Ces composés agissent alors de façon à modifier les manifestations de la maladie d'Alzheimer. Leurs propriétés pharmacologiques sont résumées dans le **Tableau IV-2**.

Tableau IV-2 : Propriétés pharmacologique des principaux AChEI

| Médicament / Nom | Laboratoire | Classe | Sélectivité | Mise sur le marché USFDA |
|-------------------------------|----------------|---------------------------|---|-----------------------------|
| Donépézil / Aricept® | Eisai / Pfizer | Pipéridine | AChE | 25/11/1996 |
| Galantamine / Réminyl® | Janssen | Alcaloïde phénanthrène | AChE + Modulation allostérique des récepteurs nicotiniques | 28/02/2001 |
| Rivastigmine / Exelan® | Novartis | Carbamate | AChE + BuChE | 25/04/2000 |

Le ladostigil est, quant à lui, un nouvel anti-Alzheimer qui possède des fonctions neuroprotectrices, une sélectivité multimodale vis-à-vis des monoamines oxydases et des propriétés d'inhibiteur d'acétylcholinestérase (**Figure IV-6**).

Ce candidat médicament, donné chez des rats de 6 mois à 16 mois, produit une diminution de l'activité astrocytaire et microgiale liée à l'âge dans de nombreuses régions hippocampiques et de la matière blanche. De plus, il réduit l'activité de l'AChE et de la BuChE dans l'hippocampe. Ce médicament ne

possède aucun effet sur la mémoire. Actuellement en test de phase IIB pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la démence associée à des troubles extrapyramidaux et la dépression.³²³

IV.6 Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

IV.6.a Outils d'évaluations

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer, dans l'état actuel des connaissances et avec les moyens disponibles, ne peut être proposé à l'ensemble de la population. Ainsi la Haute Autorité de Santé (HAS) a établi en décembre 2011 des recommandations sur les bonnes pratiques en matière de diagnostic et de prise en charge des patients atteints de MA. Ainsi les patients doivent subir cinq étapes chronologiques :

- entretien avec le médecin généraliste,
- examen clinique,
- évaluation fonctionnelle,
- évaluation cognitive globale,
- examens paracliniques.

Dans un premier temps, les troubles de la mémoire sont évalués par un médecin généraliste qui recherche le mode insidieux, l'évolution progressive de ces troubles et les antécédents familiaux.

Une fois cet entretien effectué, le patient doit subir un examen clinique qui permet d'apprécier l'état général et cardio-vasculaire du patient ainsi que son degré de vigilance et les différents déficits sensoriels et moteurs qui pourraient interférer avec les tests neuropsychologiques.

L'évaluation fonctionnelle du patient est menée et appréciée par l'utilisation de l'échelle simplifiée des activités instrumentales de la vie quotidienne (IADL simplifiée). Cette échelle permet d'évaluer la capacité du patient à utiliser le téléphone, les transports, à prendre ses médicaments et à gérer ses finances. Ainsi, la nécessité d'une aide sur un de ces quatre items constitue un retentissement significatif des troubles cognitifs sur l'activité quotidienne du patient.

L'évaluation cognitive globale est ensuite réalisée, par des tests tels que le *Mini-Mental State Examination* (MMSE) ou des tests de mémoire comme l'épreuve de rappel des 5 mots ou MIS pour *Memory Impairment State Screen*. En parallèle, des tests de mesure des capacités spatio-temporelles comme le test de l'horloge ou de fluence verbale sont réalisés.

En présence de troubles cognitifs avérés, des tests paracliniques sont menés en fonction de l'hypothèse étiologique.

Les examens biologiques tels que le dosage de la TSH (thyroïdostimuline hypophysaire), un hémogramme, une CRP (protéine C réactive), une natrémie, une calcémie, une glycémie, une albuminémie et un bilan rénal (créatinine et clairance) sont réalisés.^{324, 325}

323. Weinstock, M., et al. *Neurobiol. Aging*. **2011**, 32, 1069-78.

324. de Souza, L. C., et al. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **2011**, 82, 240-6.

325. Chintamaneni, M., et al. *ISRN Pharmacol*. **2012**, 2012, 984786.

De plus, une imagerie cérébrale systématique est recommandée pour tout trouble cognitif avéré suite aux examens précédents *via* une imagerie par résonance magnétique (IRM). Dans certains cas difficiles ou atypiques une imagerie fonctionnelle est réalisée.

Une scintigraphie cérébrale est pratiquée soit par tomographie d'émission monophotonique (TEMP), *via* l'incorporation d'un radiotraceur tel que l'iodoflupane [¹²³I] DATscan® soit par tomographie par émission de positrons (TEP) *via* l'injection de ¹⁸FDG. Le ¹⁸FDG est un glucose radiomarké au fluore 18 (¹⁸F) qui est injecté dans le système vasculaire du patient. Sa métabolisation permet d'établir une cartographie de l'activité cérébrale des différentes régions.

En parallèle de l'imagerie, des analyses du liquide cérébro-spinal sont réalisées afin de doser les protéines tau totales, tau phosphorylées et Aβ42.

IV.6.b Imagerie cérébrale et utilisation de biomarqueurs

L'imagerie médicale offre un accès à l'anatomie cérébrale et prend tout son sens lorsqu'il s'agit de maladies neurodégénératives. Cette technique joue un rôle important dans l'étude de la maladie d'Alzheimer. L'utilisation de biomarqueurs permet de suivre l'évolution de la maladie, de détecter des troubles cognitifs légers et de prédire si le patient est en train de développer la maladie d'Alzheimer.³²⁶⁻³²⁸

➤ IRM structurale

L'imagerie par résonance magnétique structurale montre la diminution de la matière grise dans le gyrus dentelé, l'hippocampe, l'amygdale et le cortex. L'imagerie peut être utilisée comme un outil discriminant des modifications structurales imputables à la maladie et des effets des traitements symptomatiques par la détermination de l'atrophie des régions cérébrales.

Afin d'utiliser une telle méthode d'imagerie comme marqueur de la maladie, il faut s'assurer de la fiabilité des mesures obtenues. Ainsi, une étude menée par Ewers *et al.* a mis en évidence que la variabilité entre douze appareils d'IRM différents est inférieure à 5%.³²⁹

Cependant, la mesure la plus couramment réalisée est l'évaluation du volume de l'hippocampe, qu'elle soit réalisée de façon visuelle ou automatisée.³³⁰ Toutefois, de nouvelles techniques d'automatisation permettent de tirer des statistiques à partir de la densité de matière grise au niveau cortical, de l'épaisseur du cortex et la densité de la substance blanche. Ces statistiques permettent d'évaluer l'évolution de la maladie.

326. Chetelat, G., *et al. Neuroreport*. **2002**, 13, 1939-1943.

327. Whitwell, J. L., *et al. Brain*. **2007**, 130, 1777-1786.

328. Whitwell, J. L., *et al. Neurology*. **2008**, 70, 512-520.

329. Ewers, M., *et al. Neurobiol. Aging*. **2006**, 27, 1051-9.

330. Hampel, H., *et al. Nature Rev. Drug Discov*. **2010**, 9, 560-574.

➤ IRM fonctionnelle

Les études de la mémoire de patients atteints de la maladie d'Alzheimer en utilisant l'IRM fonctionnelle a permis de caractériser un modèle d'activation des altérations au niveau des lobes temporaux et de lobes pariétaux. Les résultats confirment les informations obtenues par IRM structurale.³³¹

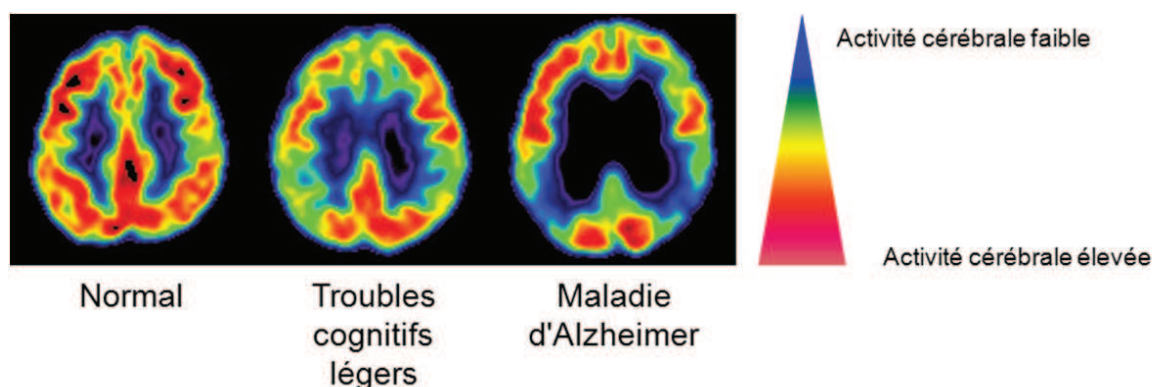
➤ Proton-MRS

La spectrométrie par résonance magnétique du proton fournit des mesures qualitatives de composés biochimiques dans le tissu cérébral. Le meilleur marqueur ^1H -MRS est l'acide aminé *N*-acétyl-aspartate (NAA) qui reflète l'état de fonctionnement des mitochondries neuronales.³³²

Une diminution de NAA indépendante de l'atrophie cérébrale est un résultat cohérent dans la MA. Ainsi, des études préliminaires ont démontré que les niveaux de NAA sont sensibles aux traitements pharmacologiques. Des essais cliniques à grande échelle de cette technique sont actuellement en cours.

Outre les NAA, plusieurs métabolites comme des molécules contenant de la choline, de la créatine et de la phosphocréatine ainsi que du glutamate et de la glutamine peuvent être détectés par cette technique d'imagerie mais leur potentiel en tant que biomarqueur dans la maladie d'Alzheimer est controversé et nécessite des études complémentaires.³³³

➤ TEP



Images de Cindee Madison et de Susan Landau, UC Berkeley.

Il est possible d'observer la métabolisation normale du ^{18}F FDG chez une personne saine (à gauche). Cette métabolisation diminue chez les patients atteints de troubles cognitifs légers (au milieu) et chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (à droite).

Figure IV-7 : Imageries TEP scan

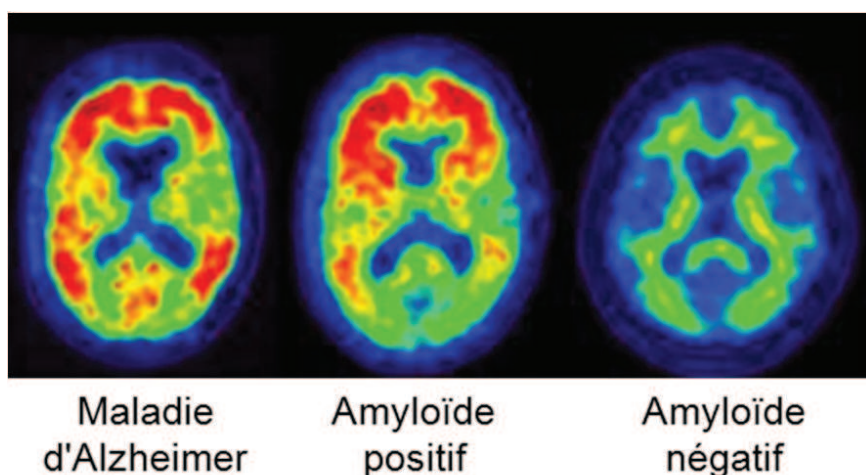
331. Bokde, A. L., et al. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2009**, 29, 147-56.

332. Moffett, J. R., et al. *Prog. Neurobiol.* **2007**, 81, 89-131.

333. Kantarci, K. *Brit. J. Radiol.* **2007**, 80 Spec No 2, S146-52.

L'imagerie par tomographie à émission de positrons en présence de ^{18}F fluorodésoxyglucose (^{18}F FDG) permet de mesurer le métabolisme du glucose lorsque l'activité neuronale est au repos. Dans la maladie d'Alzheimer l'activité neuronale est altérée, ainsi la fixation du ^{18}F FDG est réduite dans différentes zones cérébrales (**Figure IV-7**). Les modifications de la fixation du radiotraceur sont généralement attribuées aux effets des médicaments mais elles reflètent l'évolution de la maladie surtout si les imageries sont effectuées de façon régulière.

➤ TEP-amyloïde



Images de *Cindee Madison* et de *Susan Landau*, UC Berkeley.
Le Tep scan révèle la présence de plaques amyloïdes qui apparaissent en rouge-orange-jaune sur l'imagerie d'un cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer (à gauche). L'imagerie d'une personne n'ayant pas de plaque amyloïde détectable est de couleur bleu-vert (à droite). L'image amyloïde positive (au milieu) correspondant au cerveau d'un patient ne présentant pas de symptômes, mais des niveaux d'expression élevés de plaques amyloïdes.

Figure IV-8 : Imageries TEP scan-amyloïde

Différentes études ont montré que la liaison sélective d'un analogue de thioflavine marqué au ^{11}C , connu sous le nom de composé B de Pittsburgh (PIB : Pittsburgh compound B) permet de quantifier par TEP scanner la densité des dépôts d'A β chez les patients atteints de la maladie (**Figure IV-8**).³³⁴ Ce type d'imagerie permet alors d'obtenir des informations sur les agrégats d'A β de façon indépendante des changements anatomiques cérébraux.³³⁵ Ainsi, des essais cliniques de phase II sont réalisés sur ces traceurs d'A β qui pourraient être radiomarkés au ^{18}F plutôt qu'au ^{11}C , car le fluor radioactif possède une meilleure disponibilité et un temps de $\frac{1}{2}$ vie plus long.³³⁶

334. Klunk, W. E., *et al.* *Ann. Neurol.* **2004**, 55, 306-319.

335. Jack, C. R., *et al.* *Brain.* **2008**, 131, 665-680.

336. Rowe, C. C., *et al.* *Lancet Neurol.* **2008**, 7, 129-35.

V. Pharmacologie des VGLUTs

V. Pharmacologie des VGLUTs

V.1 Substrats des VGLUTs

Le transport vésiculaire du glutamate est activé par les ions chlorures et est maximal pour une concentration de 4 mM (**Paragraphe III.5**). L'affinité du L-glutamate pour ses transporteurs vésiculaires est assez faible puisqu'elle est d'environ 1 à 3 mM.^{186, 337, 338}

Cette activité contraste avec les transporteurs membranaires d'acides aminés excitateurs (EAATs) qui transportent le glutamate et l'aspartate avec une affinité de l'ordre de 5 à 50 µM.^{186, 339-341}

Les VGLUTs ne transportent ni l'aspartate, que ce soit en configuration L- ou D-, ni même le D-glutamate ou l'acide L-aminoadipique (**Figure V-1**). Ces informations indiquent que le site de liaison des VGLUTs est sélectif du glutamate.

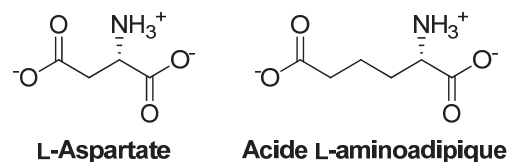


Figure V-1 : Structures du L-aspartate et de l'acide L-aminoadipique

V.2 Inhibiteurs compétitifs des VGLUTs

Il existe différentes manières de bloquer la recapture du glutamate par les VGLUTs, soit en se liant directement au site actif tels que les inhibiteurs compétitifs soit en interagissant sur d'autres sites de ces transporteurs. Ceci représentant un mode d'inhibition non compétitif.

V.2.a Les analogues d'acides aminés

Afin d'identifier des composés entrant en compétition avec le site de liaison du glutamate sur les VGLUTs, différents analogues de glutamate et de molécules connues pour moduler l'activité des récepteurs du glutamate ou des récepteurs des EAATs ont été évalués, mais la majorité ont une capacité inhibitrice faible de l'ordre de 5 mM.³⁴²

Le (2S,4R)-4-méthylglutamate et le *trans*-ACPD sont les meilleurs analogues du glutamate, inhibant les VGLUTs avec une activité respective de 0,7 et 0,4 mM, alors que le 4-méthylène-L-glutamate possède une K_i modéré de 2,9 mM (**Figure V-2**).³⁴³ Ces molécules entrent en compétition avec le glutamate, laissant

337. Maycox, P. R., et al. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 15423-15428.

338. Fykse, E. M., et al. *J. Neurochem.* **1989**, 52, 946-951.

339. Bridges, R. J., et al. *Neurosci. Lett.* **1994**, 174, 193-197.

340. Garlin, A. B., et al. *J. Neurochem.* **1995**, 64, 2572-2580.

341. Bartlett, R. D., et al. *Neuropharmacology.* **1998**, 37, 839-46.

342. Thompson, C. M., et al. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 12, 2041-2056.

343. Winter, H. C., et al. *Neurochem. Res.* **1993**, 18, 79-85.

penser qu'elles reconnaissent le site de liaison du neurotransmetteur dans les VGLUTs. Des études de stéréo-sélectivité ont montré que les isomères L sont de meilleurs inhibiteurs que leurs homologues de série D. En revanche ces analogues de glutamate possèdent certains inconvénients car ils modulent l'activité des EAATs et des récepteurs métabotropiques du glutamate avec une meilleure affinité.

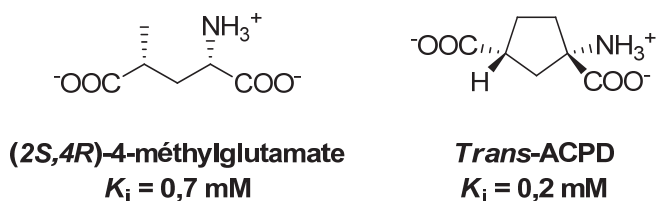


Figure V-2 : Structures et activités d'analogues du glutamate

V.2.a.i Les quinoléines

➤ Kynurénate et analogues

L'acide 4-hydroxyquinoléine-2-carboxylique, plus connu sous le nom de kynurénate, est un composé endogène du système nerveux central connu pour inhiber les iGluRs, tels que les récepteurs NMDA, kaïnates et AMPA.³⁴⁴ Cependant, cette molécule n'est pas un analogue du glutamate puisqu'elle inhibe les récepteurs NMDA, non pas en se liant au site du glutamate mais sur le site de la glycine.⁵⁴

L'évaluation de sa capacité, à inhiber le transport vésiculaire du glutamate, a permis de déterminer une K_i de 1,3 mM. De plus, les études de relation structure-activité menées avec des analogues de cet acide, par Bartlett *et al.*, ont permis d'identifier l'acide xanthurénate et l'acide 7-chloro-kynurénate comme inhibiteurs compétitifs avec des activités respectives de 0,19 et 0,59 mM (**Figure V-3**).³⁴¹

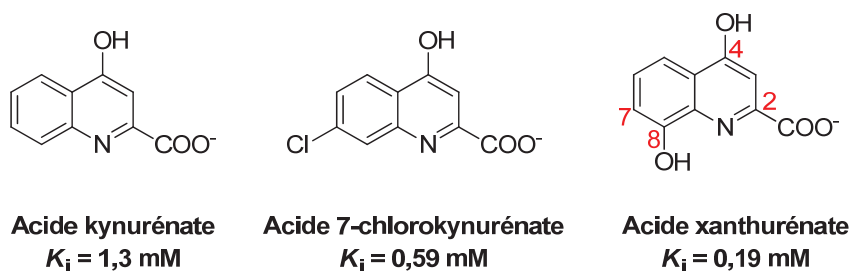


Figure V-3 : Structures et activités d'analogues de l'acide kynurénate sur la recapture du glutamate

Ces études ont mis en exergue que les analogues de pyridines possèdent une faible activité et que la présence de deux cycles aromatiques fusionnés est nécessaire pour une bonne inhibition. Les variations structurales sur le kynurénate ont montré que la présence d'une fonction acide carboxylique en position 2 est indispensable à l'activité. De plus, l'introduction d'un chlore en position 7 ou d'un alcool en position 8 permet de gagner en inhibition.^{186, 342}

344. Ganong, A. H., *et al. Brain Res.* **1983**, 273, 170-174.

➤ Les acides 2,4-quinoléinedicarboxyliques

Le kynurénate étant un inhibiteur de la recapture du glutamate, Carrigan *et al.* ont choisi d'introduire une fonction acide carboxylique en position 4 afin de mimer les deux charges négatives du glutamate.^{345, 346} Ainsi, ils ont synthétisé une cinquantaine d'analogues de l'acide 2,4-quinoléinedicarboxyliques (QDC). L'évaluation de ces composés a permis d'identifier les meilleurs substituants pour une inhibition efficace des VGLUTs.

Ces études ont montré que l'introduction de groupements inductifs ou mésomères donneurs sur le motif QDC conduit à une perte d'activité inhibitrice. Quelle que soit la position, un substituant phényle lié directement au motif QDC ne permet pas l'accès à des molécules inhibant les VGLUTs. Par contre, il a été remarqué que le fait d'introduire un substituant biphenyle sur le motif QDC en position 6 du cycle aromatique conduit à un large gain d'inhibition. Le remplacement du groupement phényle par un motif biaryle permet une augmentation d'un log d'inhibition (**Figure V-4**).

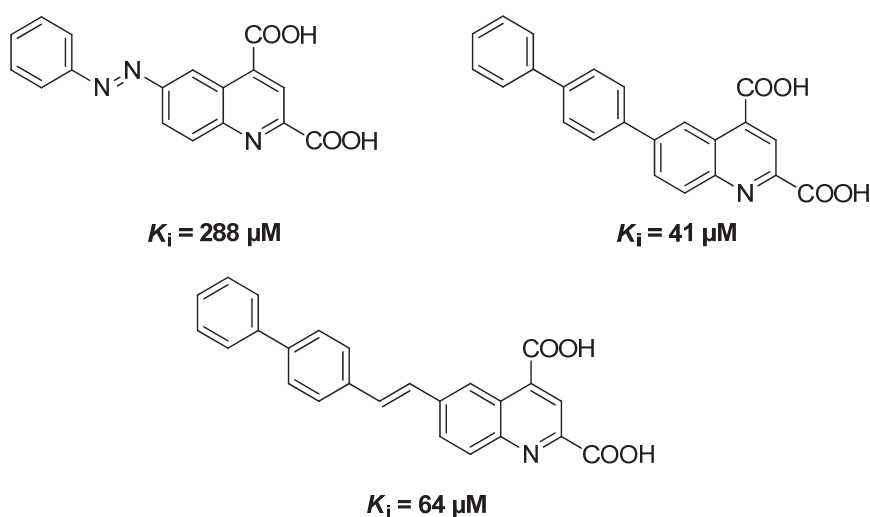


Figure V-4 : Structures des meilleurs inhibiteurs de VGLUTs série QDC et leur K_i estimées d'après Carrigan *et al.*³⁴⁶

V.2.b Les colorants azoïques

Le Bleu Trypan ($CI_{50} = 50 \text{ nM}$) et le Bleu Evans ($CI_{50} = 90 \text{ nM}$) sont les meilleurs inhibiteurs compétitifs connus des VGLUTs (**Figure V-5**).³⁴⁷⁻³⁴⁹ Ils sont composés de deux motifs naphthalène-sulfoniques reliés par un lien biphenyle azo.

345. Carrigan, C. N., *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 2607-2612.
346. Carrigan, C. N., *et al. J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2260-2276.
347. Roseth, S., *et al. J. Neurochem.* **1995**, 65, 96-103.
348. Roseth, S., *et al. Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 1243-1249.
349. Fonnum, F., *et al. Prog. Brain Res.* **1998**, 116, 87-101.

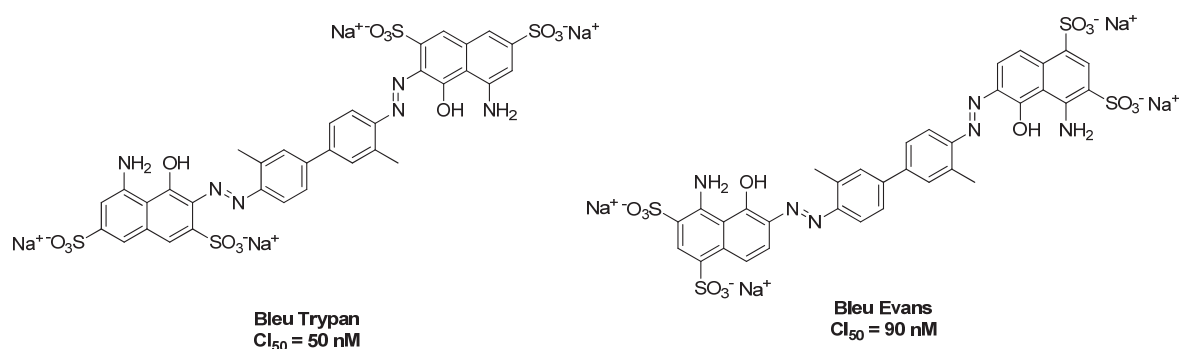
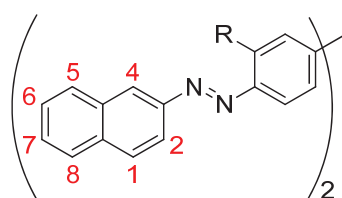


Figure V-5 : Structures du Bleu Trypan et du Bleu Evans et leurs activités inhibitrices sur les VGLUTs

Les premières études des relations structure-activité ont permis d'établir une comparaison avec le substrat naturel des VGLUTs.³⁴⁷⁻³⁴⁹ Ainsi, la fonction naphtylamine, bien que non protonnée, serait un bioisostère de la fonction α -aminée du glutamate. Au regard, de la faible différence d'activité entre le Bleu Trypan et le Bleu Evans, il semblerait que la position des charges négatives (des sulfonates) ne soit pas critique pour une bonne reconnaissance au site de liaison (**Tableau V-1**).

Les structures du Bleu Evans (Cl₅₀ = 90 nM) et du Chicago Sky Blue (Cl₅₀ = 3000 nM) diffèrent par la présence respective de groupements méthyles et méthoxy sur le lien biphenyle. Cependant, il existe deux logs d'écart entre leurs activités. Il semble alors qu'une grande partie de leur capacité d'inhibition soit liée aux substituants portés par ce motif biaryle (**Tableau V-1**). Cette caractéristique de structure-activité est intéressante puisque les modifications ne touchent pas la partie « mime » du glutamate.

Tableau V-1 : Structures et activités des colorants azoïques symétriques d'après Thompson *et al.*³⁴²



Colorant azoïque symétrique

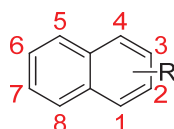
| Nom | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | R | Cl ₅₀ (nM) |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----|-----------------------|
| Bleu Trypan | H | SO ₃ H | OH | NH ₂ | H | SO ₃ H | H | Me | 50 |
| Bleu Evans | H | H | OH | NH ₂ | SO ₃ H | H | SO ₃ H | Me | 90 |
| Rouge Congo | SO ₃ H | H | NH ₂ | H | H | H | H | Z | 550 |
| Benzopurpurine 4B | SO ₃ H | H | NH ₂ | H | H | H | H | Me | 680 |
| Bleu Ciel Chicago | H | H | OH | NH ₂ | SO ₃ H | H | SO ₃ H | OMe | 3000 |

Z = N=N-Ar

De plus, la présence d'une molécule symétrique apparaît plus prometteuse en comparant les activités des colorants symétriques, tels que le Bleu Trypan ($CI_{50} = 50$ nM) et le Bleu Evans ($CI_{50} = 90$ nM), avec celles des composés asymétriques, comme le Gallion ($CI_{50} = 4000$ nM) ou le Chromotrope 2R ($CI_{50} = 12000$ nM) (**Tableau V-1, Tableau V-2**).

A ce stade, deux points importants peuvent être mis en exergue. Tout d'abord, le site de liaison du substrat dans les VGLUTs tolère la présence de sulfonates à la place des carboxylates du glutamate et la partie hydrophobe biphényle possède une grande influence sur la liaison au site actif.

Tableau V-2 : Structures et activités des colorants azoïques asymétriques d'après Thompson *et al.*³⁴²



Colorant azoïque asymétrique

| Nom/Série | 1 | 2 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | R | CI_{50} (nM) |
|--------------------------------|---|-------------------|----|-----------------|---|-------------------|---|-----------------|----------------|
| Naphtol Bleu Noir | H | SO ₃ H | OH | NH ₂ | X | SO ₃ H | H | Z | 330 |
| Gallion | H | SO ₃ H | OH | NH ₂ | H | SO ₃ H | H | Z | 4000 |
| Chromotrope 2R | H | SO ₃ H | OH | OH | H | SO ₃ H | H | Z | 12500 |
| Acide 4-amino-2,7-disulfonique | H | SO ₃ H | H | H | H | SO ₃ H | H | NH ₂ | >50000 |

X = N=N-PhNO₂ ; Z = N=N-Ar

Au regard des informations précédemment décrites, il est possible de déterminer différentes informations sur ces colorants :

- la présence d'une liaison azo est indispensable sous peine d'une perte d'activité de deux à trois logs,
- la liaison azo doit être située à proximité d'un groupement capable d'établir des liaisons hydrogènes tels que NH₂ ou OH,
- ni le nombre ni la position des sulfonates ne sont indispensables à la reconnaissance du site de liaison,
- les substituants doivent être hydrophobes et plans pour avoir une bonne activité

Les activités intéressantes et le potentiel de pharmacomodulation de ces colorants en font une série intéressante à développer et à évaluer.

V.2.c Inhibiteur indirect naturel

L'IPF, pour inhibiteur de facteur protéique, est un inhibiteur endogène capable de bloquer la recapture du glutamate. Cette protéine, localisée dans le cytosol des synaptosomes, peut diminuer l'accumulation vésiculaire du glutamate et du GABA avec une activité de 24 nM.^{350, 351} Ce facteur proviendrait d'un clivage de l' α -fodrine. Cette protéine cytosquelettique est exprimée de façon ubiquitaire mais elle ne possède aucune activité inhibitrice directe sur les VGLUTs. Ainsi, l' α -fodrine serait capable, par interaction protéine-protéine de réguler l'accumulation et donc le relargage de neurotransmetteurs.

V.2.d Les inhibiteurs canaux et de la V-ATPase

L'acide 4,4'-diisothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (DIDS) et l'acide 4-acétamido-4'-isothiocyanatostilbène-2,2'-disulfonique (SITS) sont des inhibiteurs de la recapture du glutamate qui agissent en bloquant les ions canaux avec des Cl_{50} respectives de 0,7 et 2 μ M (**Figure V-6**).^{347, 352} D'un point de vue mécanistique, le DIDS se lierait directement sur les VGLUTs et plus particulièrement sur le site de liaison du chlore.³⁵²

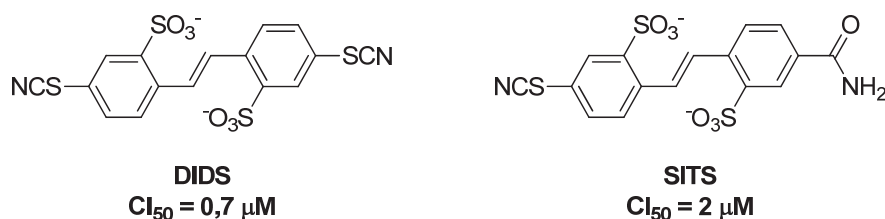


Figure V-6 : Structures et activités du DIDS et du SITS^{347, 352}

La bumétanide et la furosémide sont également des inhibiteurs canaux. Ils inhibent les VGLUTs avec des activités respectives de 319 et 309 μ M (**Figure V-7**).³⁴⁷

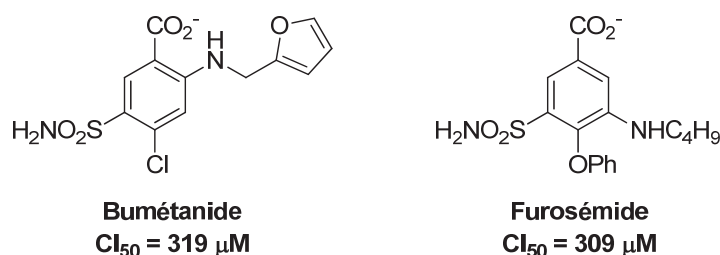
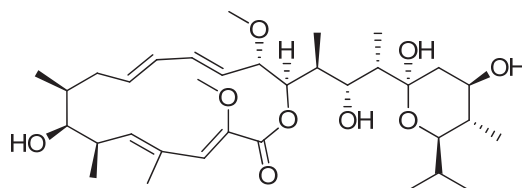


Figure V-7 : Structures et activités de la bumétanide et de la furosémide³⁴⁷

La bafilomycine est un inhibiteur de la V-ATPase qui bloque avec la même activité, de 15 nM, la recapture du glutamate et du GABA (**Figure V-8**).³⁴⁷

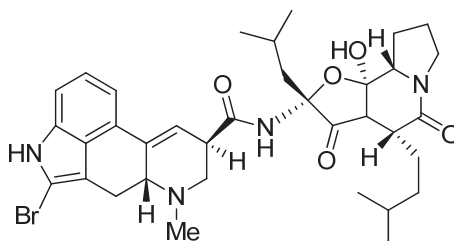
350. Gegelashvili, G., et al. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 52, 6-15.
 351. Tamura, Y., et al. *J. Neurochem.* **2001**, 76, 1153-1164.
 352. Hartinger, J., et al. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 23122-23127.



Bafilomycine
 $CI_{50} = 15 \text{ nM}$

Figure V-8 : Structure et activité de la bafilomycine³⁴⁷

La bromocriptine inhibe les VGLUTs avec une activité de $22 \mu\text{M}$ (**Figure V-9**).³⁵³ Cet alcaloïde agit en modulant la force motrice des VGLUTs, en influençant le ΔpH et le $\Delta\psi$.



Bromocriptine
 $CI_{50} = 22 \mu\text{M}$

Figure V-9 : Structure et activité de la bromocriptine³⁵³

Cette molécule est aussi agoniste des récepteurs dopaminergiques. Son action sur le système dopaminergique explique son utilisation dans le traitement de la maladie de Parkinson.³⁵⁴

V.2.e Rose Bengale : un inhibiteur non compétitif

Le Rose Bengale est un analogue polyhalogéné de la fluorescéine. Il inhibe le transport vésiculaire du glutamate avec une activité de 25 nM alors que la fluorescéine est inactive (**Figure V-10**).^{355, 356}

Le traitement de synaptosomes par le Rose Bengale provoque une diminution de l'accumulation vésiculaire du glutamate et les analyses cinétiques montrent qu'il agit de façon non-compétitive. La recapture du glutamate étant dépendante d'un gradient électrochimique de protons généré par la V-ATPase, il a été suspecté que cet inhibiteur agisse directement sur cet enzyme. En effet, le Rose Bengale inhibe de façon dose-dépendante la V-ATPase avec une CI_{50} de 918 nM . Il existe alors une différence de deux logs d'inhibition avec la recapture vésiculaire du glutamate indiquant que l'effet inhibiteur du Rose Bengale à

353. Carlson, M. D., et al. *J. Neurochem.* **1989**, 53, 1889-94.
 354. van Hilten, J. J., et al. *Cochrane Database Syst Rev.* **2007**.
 355. Bole, D. G., et al. *Neurochem. Res.* **2005**, 30, 363-369.
 356. Pietrancosta, N., et al. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6922-6933.

faible concentration n'est pas dû à son activité inhibitrice du gradient électrochimique de protons. Ces observations soulèvent la possibilité que le Rose Bengale agisse sur un site allostérique des VGLUTs. Les membres de la famille du Rose Bengale comme l'Erythrosine B ou la Phloxine B pourraient bloquer le gradient électrochimique de protons induisant un changement conformationnel du transporteur ou de l'efflux de protons, processus indispensable au transport de neurotransmetteur.^{114, 357-360}

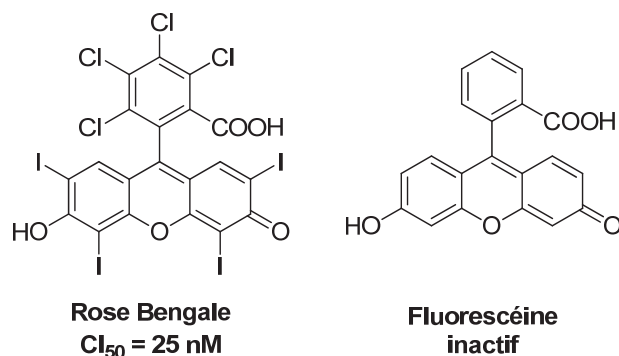


Figure V-10 : Structures et activités du Rose Bengale et de la fluorescéine^{355, 356}

Le site précis de fixation de ces colorants reste inconnu. Ainsi, le développement de dérivés du Rose Bengale pourrait apporter des informations quant à la cible biologique de ces composés.

V.3 Conclusions

La recapture vésiculaire du glutamate par les VGLUTs est affectée par différents mécanismes d'inhibition.

Ainsi, certains composés agissent en bloquant les protéines essentielles au maintien du gradient électrochimique de protons et de surcroît du potentiel de membrane généré par la V-ATPase. Des inhibiteurs, comme les quinoléines ou les colorants azoïques, inhibent de façon compétitive les VGLUTs ou de façon non compétitive en se liant au site chlore des transporteurs. Les colorants de type Rose Bengale possèdent une bonne capacité inhibitrice de cette recapture de neurotransmetteurs, mais le site de liaison de ces inhibiteurs reste à déterminer. Il apparaît alors que la pharmacologie de ces transporteurs est assez pauvre et peu de structures sont capables d'inhiber sélectivement et efficacement les VGLUTs.

357. Njus, D., *et al. Biochim. Biophys. Acta.* **1986**, 853, 237-265.

358. Shioi, J., *et al. Biochem. J.* **1990**, 267, 63-68.

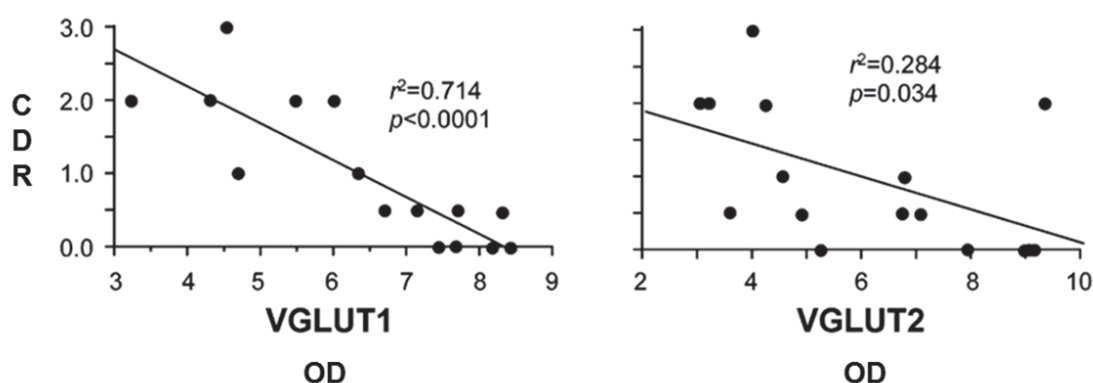
359. Tabb, J. S., *et al. J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 15412-15418.

360. Wolosker, H., *et al. J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11726-11731.

VI. Présentation des axes de travail

VI. Présentation des axes de travail

Le besoin d'outils pharmacologiques est crucial pour comprendre l'implication fonctionnelle des VGLUTs en conditions normales et pathologiques. Ainsi, le développement de composés affins et sélectifs représente un défi important pour la compréhension du rôle des VGLUTs dans la neurotransmission. De plus, avec la caractérisation récente de la corrélation entre une diminution du taux de transporteurs vésiculaires du glutamate et un score de démence élevé dans la maladie d'Alzheimer, il semblerait que de telles molécules puissent être utilisées en tant que traceurs pour le diagnostic de pathologies du système nerveux central (Figure VI-1).²¹⁰



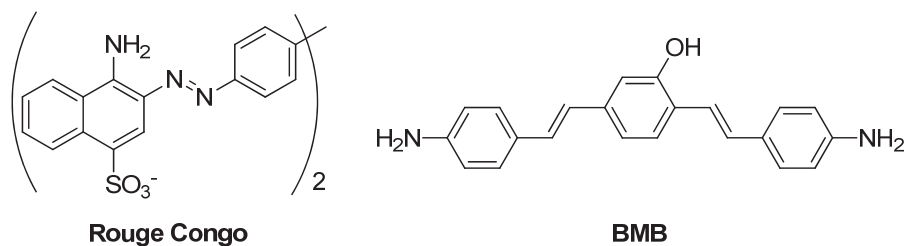


Figure VI-2 : Structures du Rouge Congo et du BMB

Ces deux molécules ont servi de base à mon travail de thèse qui s'est déroulé en trois axes majeurs :

- conception et synthèse autour du synthon Rose Bengale,
- développement et synthèse d'analogues du Bleu Trypan,
- évaluation biologique des composés synthétisés.

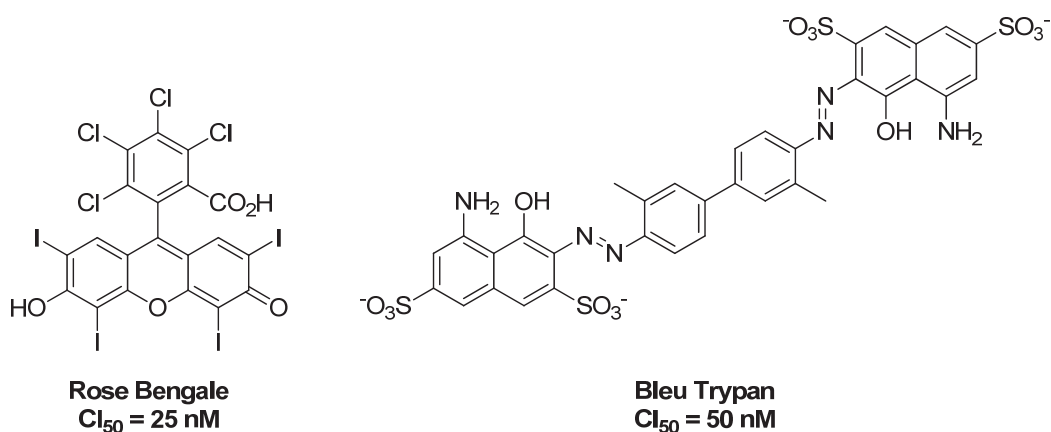


Figure VI-3 : Meilleurs inhibiteurs connus des VGLUTs

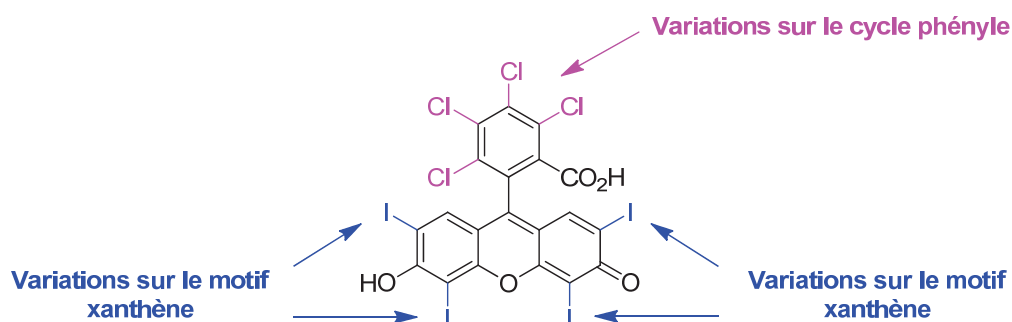


Figure VI-4 : Axes de travail autour du Rose Bengale

Nous avons donc cherché à synthétiser une famille d'analogues du Rose Bengale. Deux sites de pharmacomodulations ont été plus particulièrement sélectionnés en fonction des activités décrites des analogues connus et des facilités d'accès d'un point de vue synthétique. La fluorescéine est un composé dépourvu d'halogène sur le cycle xanthène et est inactive sur l'inhibition des VGLUTs. Ainsi, des pharmacomodulations de ce motif ont été envisagées afin d'appréhender leur impact sur la recapture du glutamate. Le développement d'une chimiothèque d'analogues du Rose Bengale a nécessité le développement d'une voie de synthèse qui se réalise en deux étapes. Nous nous sommes alors proposés de déterminer les intermédiaires clés et les mécanismes de formation du Rose Bengale (**Figure VI-4**).

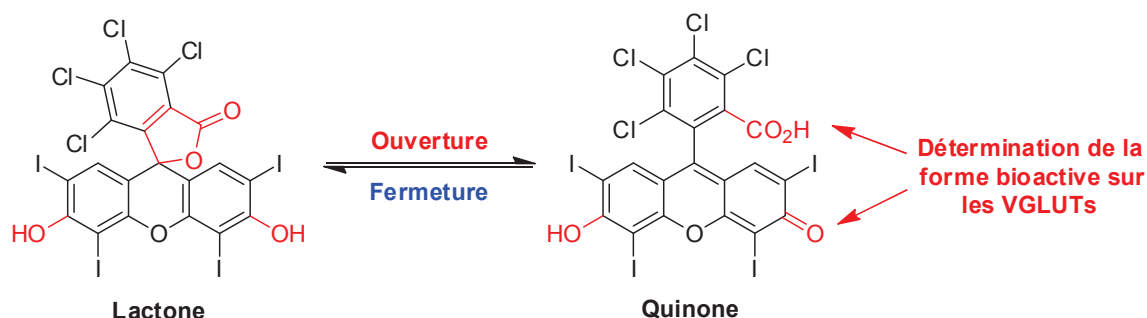


Figure VI-5 : Détermination de la forme bioactive reconnue par les VGLUTs

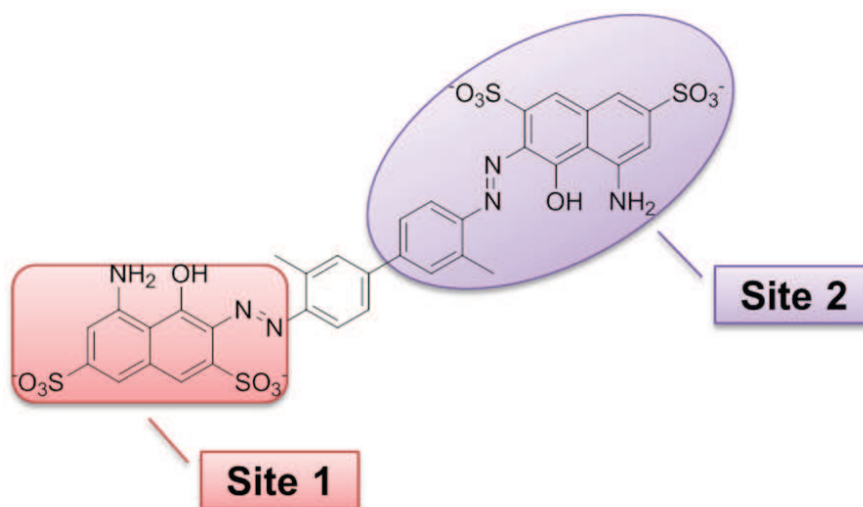


Figure VI-6 : Sites 1 et 2 de pharmacomodulation du Bleu Trypan

La littérature montre que le Rose Bengale et ses analogues peuvent exister sous deux formes en fonction du pH.³⁶³⁻³⁶⁵ Nous avons cherché à déterminer qu'elle est la forme prédominante à pH

363. Markuszewski, R., *et al. Talanta*. **1980**, 27, 937-946.

364. Anthoni, U., *et al. Struct. Chem.* **1995**, 6, 161-165.

365. Vodolazkaya, N., *et al. Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, 79, 1437-1445.

physiologique et plus particulièrement la forme bioactive qui se lie aux VGLUTs dans les conditions physiologiques (**Figure VI-5**).

Le Bleu Trypan étant le meilleur inhibiteur compétitif connu, nous nous sommes proposés de développer trois familles de colorants analogues du Bleu Trypan. Pour se faire, trois sites de pharmacomodulations ont été sélectionnés avec, dans un premier temps, un objectif de simplification structurale. Le Bleu Evans est un colorant diazoïque qui possède une bonne activité sur les VGLUTs (90 nM). Sa structure diffère de celle du BT par la position des fonctions sulfonates sur le motif naphthalènesulfonique. La différence d'activité entre ces deux colorants, même faible, indique que des pharmacomodulations du site 1 ont une influence sur l'activité des colorants azoïques (**Figure VI-6**). Afin d'obtenir des molécules facilement radiomarquables et de déterminer la structure minimale active du Bleu Trypan, des pharmacomodulations du site 2 ont été envisagées (**Figure VI-6**). Le site 3 correspond au lien biaryle et est décrit comme possédant une influence sur l'activité de ces colorants. (**Figure VI-7**) En effet, le Chicago Sky Blue est un analogue du Bleu Trypan possédant une CI_{50} de 3000 nM.³⁴² Sa structure diffère de celle du BT par la présence de groupements méthoxy à la place des groupements méthyles. L'accès aux analogues de Bleu Trypan a nécessité le développement d'une voie de synthèse ainsi que la maîtrise des paramètres impliqués dans chacune des deux étapes clés (diazotation et copulation azoïque). Différentes études de cinétique et de régiosélectivité ont été nécessaires à la compréhension des mécanismes de formation de ces molécules.

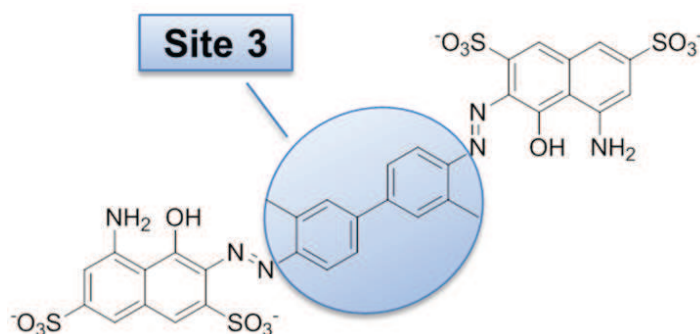


Figure VI-7 : Site 3 de pharmacomodulation du Bleu Trypan

Enfin, l'évaluation biologique des molécules synthétisées constitue le troisième volet de ce travail de thèse. Le développement d'une chimiothèque de colorants permet de réaliser une étude de relation structure-activité d'inhibition du transport du glutamate par les VGLUTs. L'étude de la sélectivité de ces molécules, vis-à-vis d'autres transporteurs de neurotransmetteurs, est également nécessaire afin d'appréhender le potentiel de ces colorants en tant qu'outils.

L'objectif, à long terme de ce projet, est le développement de molécules sélectives, affines des transporteurs vésiculaires du glutamate, non cytotoxiques et actives *in vivo*. Après évaluation de leur potentiel en tant que marqueur, ces composés seront radiomarqués, à l'instar du ^{18}F FDG. Ils pourront alors être utilisés en tant qu'outils de diagnostic en imagerie PET pour la caractérisation de neuropathologies et notamment la maladie d'Alzheimer.^{361, 362}

Résultats et Discussion

VII. Synthèse de colorants

VII. Synthèse de colorants

Le paragraphe traitant de la synthèse des colorants est divisé en trois axes. Le premier concerne la synthèse des analogues du Rose Bengale, le deuxième concerne la synthèse des dérivés du Bleu Trypan puis le troisième volet a pour objet la purification et la caractérisation de ces colorants.

VII.1 Le Rose Bengale et les dérivés de fluorescéine

VII.1.a Introduction

Adolf von Baeyer est un chimiste allemand, spécialisé dans la chimie des colorants, qui découvrit et synthétisa pour la première fois la fluorescéine en 1871, molécule connue jusqu'alors sous le nom de « pyoverdine ».^{366, 367} Le Rose Bengale est un composé halogéné dérivant de la fluorescéine, décrit et synthétisé par Rudolph Gnehm en 1881 dans les tables de Schults.³⁶⁸

Le Rose Bengale est le composé qui possède la meilleure capacité inhibitrice des transporteurs vésiculaires du glutamate avec une CI_{50} mesurée à 22 nM.³⁶⁵ Ainsi, cette molécule est le composé qui a tout d'abord été sélectionné comme base de travail pour le développement de modulateurs de l'activité des VGLUTs.

L'accès au Rose Bengale et à ses dérivés met en jeu deux étapes. La première consiste à condenser un anhydride tétrachlorophtalique avec deux molécules de résorcinol permettant l'accès au motif fluorescéine suivi d'une étape d'iodation. (**Schéma VII-1**)

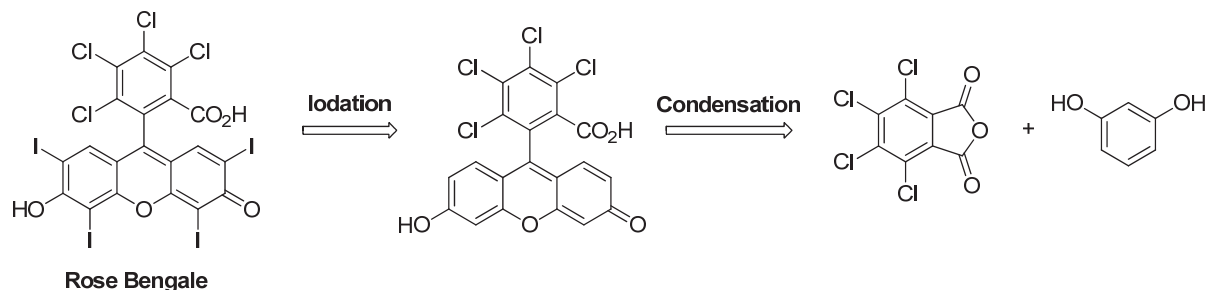


Schéma VII-1 : Schéma rétrosynthétique du Rose Bengale

Dans la littérature, cette condensation est réalisée principalement selon deux voies de synthèse :^{366, 369,}

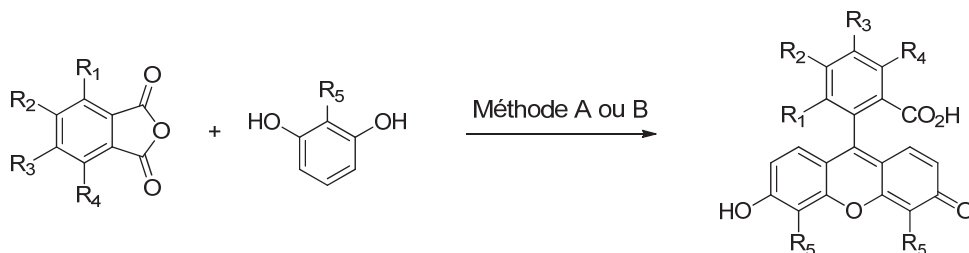
³⁷⁰

- soit en utilisant un acide de Lewis tel que le chlorure de zinc ($ZnCl_2$),^{366, 373}
- soit en utilisant un acide de Brønsted, comme l'acide méthane sulfonique.^{371, 374}

366. von Bayer, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1871**, 5, 255-259.
 367. Orndorff, W. R., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **1927**, 49, 1272-1280.
 368. Rose, R. E. *J. Chem. Educ.* **1926**, 3, 973.
 369. Sun, W. C., *et al. J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6469-6475.
 370. Burdette, S. C., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7831-7841.
 371. Hirano, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6555-6562.
 372. Ueno, Y., *et al. Synthesis.* **2004**, 2591-2593.
 373. Lukhtanov, E. A., *et al. J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2424-2427.
 374. Ueno, T., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14079-14085.

Ces méthodologies de synthèse permettent l'accès aux dérivés de fluorescéine avec de bons rendements à grande échelle (**Schéma VII-2**).^{369, 371, 372}

Traditionnellement, la synthèse de la fluorescéine est réalisée par fusion du résorcinol, de l'anhydride tétrachlorophtalique en présence d'un acide de Lewis à température élevée selon un mécanisme d'acylation de type Friedel et Craft. Il apparaît que cette méthodologie ne serait pas adaptée à une échelle de synthèse de l'ordre de la centaine de milligrammes en raison de la sublimation d'une grande partie des réactifs. Ainsi, l'acide méthane sulfonique s'est révélé être un acide de Brønsted efficace puisqu'il joue à la fois le rôle de solvant et de catalyseur de cette réaction.



Méthode A: $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$, 80°C ; Méthode B: ZnCl_2 , 180°C , neat

Schéma VII-2 : Formation de fluorescéine par condensation de d'anhydride phtalique

La deuxième étape, permettant d'accéder au Rose Bengale, est une étape d'iodation sélective des quatre positions situées en ortho du phénol et de la cétone du motif xanthène.

L'iodation de phénol et d'autres composés aromatiques constitue un sujet qui continue d'intéresser les chimistes organiciens en raison d'une utilisation importante des dérivés iodés en chimie pallado-catalysée, en chimie médicinale et comme agent de diagnostic en imagerie médicale.^{375, 376}

Bien que de nombreuses méthodes d'iodation aient été décrites, l'iodation directe par le diiode est une voie simple pour obtenir des composés aromatiques iodés.³⁷⁷ Mais cette réaction nécessite l'action d'un composé oxydant sur le diiode permettant de générer une espèce I^+ hautement réactive. Les méthodes couramment utilisées pour ioder un composé aromatique, un phénol ou un hétérocycle, utilisent une large gamme d'agents iodants tels que I_2/HgO , $\text{I}_2/\text{tétrabutylammonium peroxydisulfate}$, $n\text{Buli}/\text{CF}_3\text{CH}_2\text{I}$, $\text{NIS}/\text{CF}_3\text{SO}_3\text{H}$, KBrO_3/KI ou du diiode couplé avec de l'oxone, de l' AgSO_4 , du NaIO_4 , de l' HIO_4 ou encore avec de l'urée dans l'eau.³⁷⁸⁻³⁸⁶ En revanche, ces méthodologies de synthèse conduisent le plus souvent à la formation de nombreux produits secondaires à cause des conditions drastiques de réaction et de l'utilisation

375. Bennacef, I., *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4533-4541.
376. Kung, H. F., *et al. J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5258-5264.
377. Stavber, S., *et al. Synthesis.* **2008**, 2008, 1487-1513.
378. Orito, K., *et al. Synthesis.* **1997**, 1997, 23-25.
379. Blackmore, I. J., *et al. Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6671-6672.
380. Olah, G. A., *et al. J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3194-3195.
381. Sathiyapriya, R., *et al. J. Chem. Res.* **2006**, 2006, 575-576.
382. Narender, N., *et al. Synthetic Commun.* **2002**, 32, 2319-2324.
383. Wing-Wah, S. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6223-6224.
384. Kraszkiewicz, L., *et al. Synthesis.* **2006**, 2006, 1195-1199.
385. Suzuki, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, 44, 2871-2873.
386. Pavlinac, J., *et al. Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 699-707.

d'agents oxydants puissants. Pour répondre à cette problématique en 2008, Kataoka *et al.* ont développé une méthode électrochimique d'iodation de composés aromatiques mais cette méthode n'est pas régiosélective.³⁸⁷

Au regard des informations décrites dans la littérature et afin de pouvoir accéder à des dérivés de fluorescéine substitués par des iodes sur le motif xanthènes, deux méthodologies décrites pour leur bonne sélectivité d'iodation ont été sélectionnées (**Schéma VII-3**).^{388, 389}

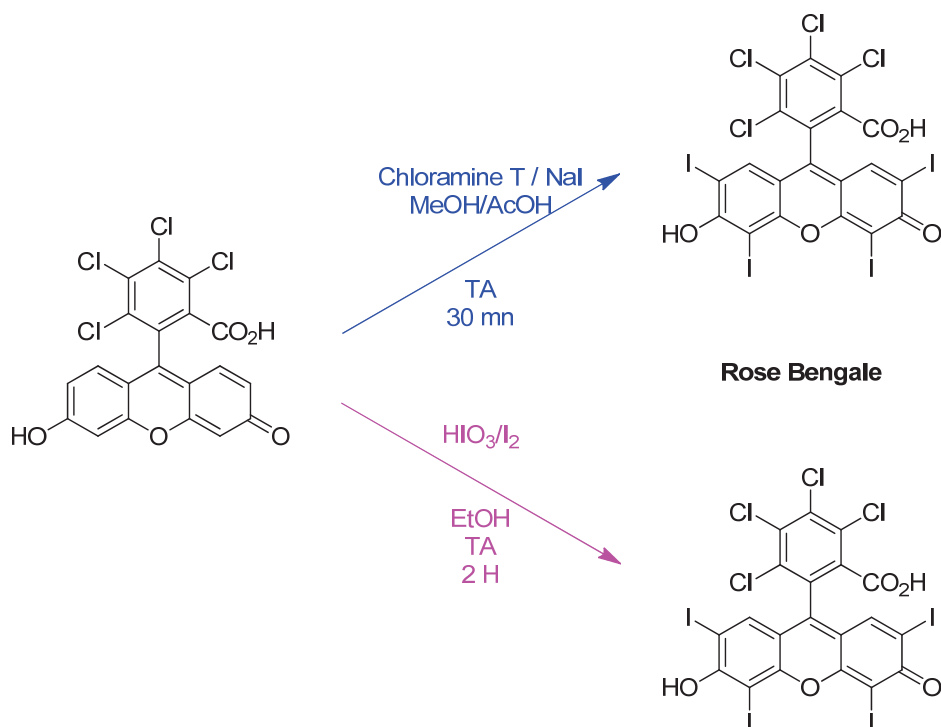


Schéma VII-3 : Méthodologie d'iodation d'analogues de fluorescéine

Au cours du développement d'analogues de fluorescéine et de Rose Bengale, nous nous sommes proposés d'évaluer les paramètres des deux étapes ainsi que d'étudier le mécanisme de condensation de type Friedel et Craft. L'optimisation de cette voie de synthèse a pour objectif le développement d'une chimiothèque de composés permettant de déterminer l'influence des substituants portés par ce synthon sur l'activité d'inhibition des VGLUTs (**Schéma VII-1**).

Le travail de chimie exposé dans ce chapitre a fait l'objet d'un an de stage post-doctoral d'Albane KESSLER dont les molécules synthétisées portent l'appellation **LSP7-** et d'une partie de ce travail de thèse sous l'appellation **LSP9-**.

387. Kataoka, K., *et al.* *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12, 1130-1136.

388. Glick, S. M., *et al.* *Nature.* **1963**, 199, 784-787.

389. Patil, B. R., *et al.* *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7179-7181.

VII.1.b Synthèse du Rose Bengale et des dérivés de fluorescéine

VII.1.b.i Synthèse de la fluorescéine

Afin de pouvoir développer une chimiothèque, nous nous sommes proposés d'évaluer les deux principales voies de synthèse décrites à savoir en utilisant de l'acide méthane sulfonique ou un catalyseur au zinc.³⁶⁹⁻³⁷³

➤ Synthèse de fluorescéine en présence d'acide méthane sulfonique

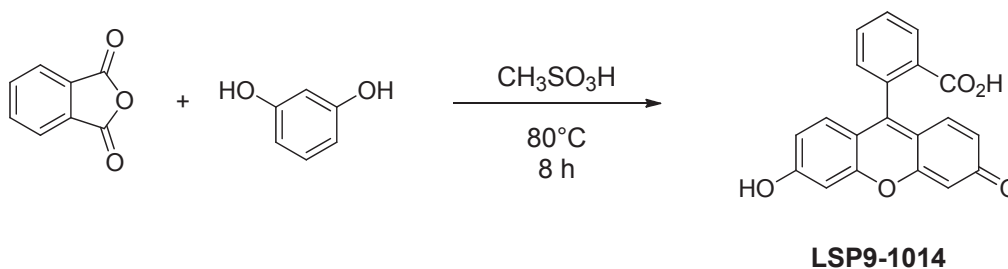
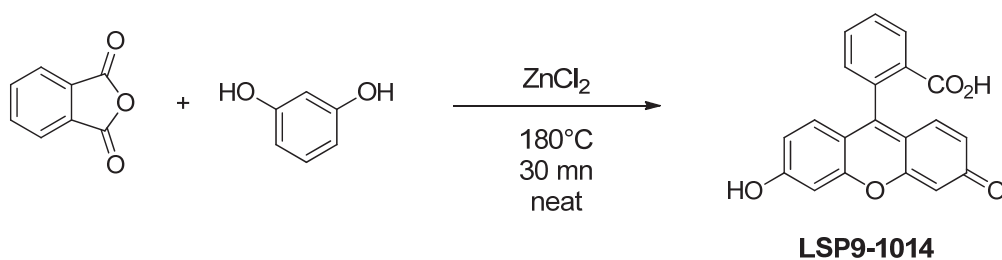
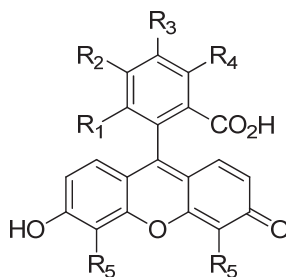


Schéma VII-4 : Formation de fluorescéine en présence d'acide méthane sulfonique

Dans un premier temps, il a été choisi de réaliser la condensation du résorcinol et de l'anhydride phtalique en présence d'acide méthane sulfonique ($pK_a = -2$), utilisé à la fois comme solvant et comme activateur. Cette méthodologie de synthèse est décrite comme conduisant à l'obtention de la fluorescéine avec de bons rendements.^{369, 371, 372} Deux équivalents de résorcinol sont dissouts dans une solution d'acide méthane sulfonique puis l'anhydride phtalique est additionné et le milieu réactionnel est chauffé à 80°C pendant 8 heures. La purification par précipitation ayant échouée, le composé **LSP9-1014** a été obtenu avec 12% de rendement après extraction (**Schéma VII-4**). Ce traitement permet de s'affranchir de la présence d'anhydride phtalique et de résorcinol à pH acide. Dans la littérature, aucune information n'a pu être trouvée concernant d'éventuels problèmes de purification lors de ce type de synthèse, outre l'échelle à laquelle la réaction est réalisée.³⁶⁹ En effet cette réaction n'est pas adaptée à une échelle de l'ordre de la centaine de milligrammes à cause de la sublimation des réactifs mais est généralement réalisée sur plusieurs grammes de réactifs. De plus Sun *et al.* ont pu constater que la condensation de l'anhydride phtalique avec certains résorcinols ne se réalise pas.³⁶⁹ Ainsi, une autre méthodologie de synthèse a été explorée.

La seconde méthode de condensation est plus drastique puisqu'elle est réalisée sans solvant et en présence d'un catalyseur au zinc ($ZnCl_2$). Cette synthèse a permis l'accès au motif fluorescéine avec un rendement de 93 % et la simplification de l'étape de purification simplifiée. La fusion du résorcinol, de l'anhydride phtalique et du catalyseur, est réalisée à 180°C sans solvant favorisant ainsi la réalisation de réactions intermoléculaires (**Schéma VII-5**).

➤ *Synthèse de fluorescéine en présence de chlorure de zinc***Schéma VII-5 : Formation de fluorescéine (LSP9-1014) en présence d'acide de Lewis**➤ *Développement d'analogues de fluorescéine***Tableau VII-1 : Résultats des réactions de condensation**

| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | Rendements |
|------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|------------|
| LSP9-1014 | H | H | H | H | H | 93 % |
| LSP9-1017 | Cl | Cl | Cl | Cl | H | 76 % |
| LSP7-1060 | Cl | H | H | Cl | H | 67 % |
| LSP7-1073 | H | Cl | Cl | H | H | 89 % |
| LSP7-1064 | F | F | F | F | H | 69 % |
| LSP9-1025 | Br | Br | Br | Br | H | 36 % |
| LSP7-1049 | H | H | H | H | CH ₃ | 76 % |
| LSP7-1030^a | NO ₂ /H | H | H | H/NO ₂ | H | 63 % |
| LSP7-1029^a | H | H/COOH | COOH/H | H | H | 51 % |
| LSP7-1076 | OH | H | H | H | H | 39 % |
| LSP7-1062^a | H | CH ₃ /H | H/CH ₃ | H | H | 87 % |
| LSP7-1065^a | H | tBu/H | H/tBu | H | H | 98 % |

^a : Mélange de régioisomères

Afin de développer une chimiothèque de composés de type fluorescéine, l'utilisation d'une catalyse au chlorure de zinc a été privilégiée. Par cette voie, douze composés ont été synthétisés. Les structures et rendements sont exposés dans le **Tableau VII-1**.

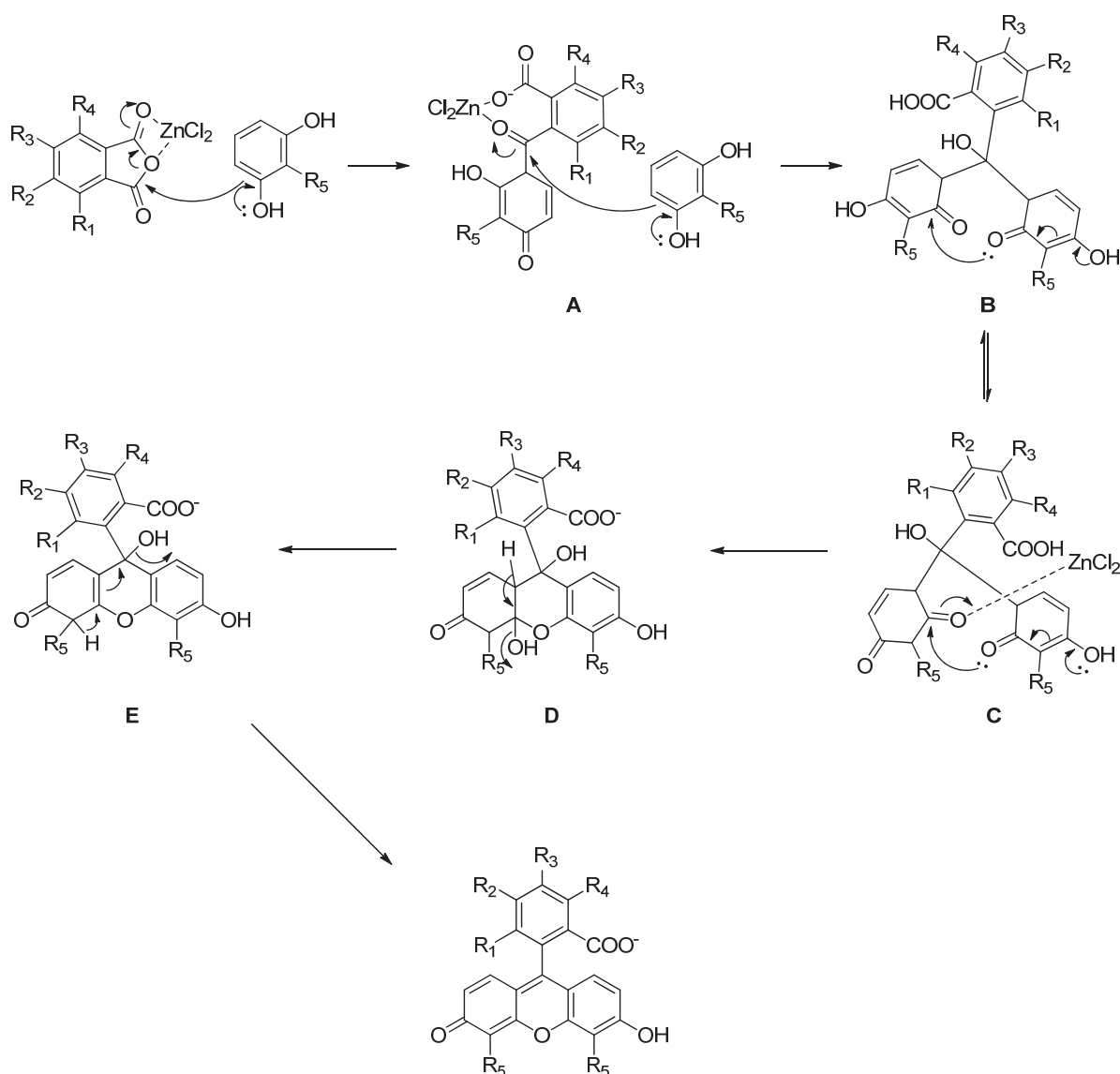
VII.1.b.ii Mécanisme de polycondensation : formation du cycle xanthène


Schéma VII-6 : Mécanisme proposé de formation des dérivés fluorescéines

La condensation du résorcinol sur l'anhydride phtalique se réalise selon un mécanisme de multiples et successives C-acylation de type Friedel et Craft (**Schéma VII-6**).³⁹⁰ Le chlorure de zinc chélate deux oxygènes de la fonction anhydride rendant un des carbones de l'anhydride plus électrophile. La première attaque du résorcinol sur l'anhydride activé provoque l'ouverture du cycle conduisant à l'intermédiaire **A**. Une nouvelle chélation du catalyseur permet d'activer la fonction cétone. Une seconde attaque du résorcinol

390. Friedel, C., et al. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1877**, 84, 1392-1395.

est réalisée sur l'intermédiaire **A** conduisant à l'intermédiaire **B**, molécule possédant trois cycles aromatiques non fusionnés. L'action du chlorure de zinc induit une tautomérie donnant accès à l'intermédiaire **C**. A ce stade, deux fonctions cétone pourraient être chélatées par l'acide de Lewis. Le chlorure de zinc va se complexer avec l'oxygène de la cétone qui permet l'obtention d'un cycle à 6 chaînons. En effet, la chélation de l'autre cétone engendrerait la formation d'un cycle à 8 atomes moins favorisé qu'un cycle à 6 atomes. Il s'en suit, sous l'action du chlorure de zinc, deux étapes de déshydratation conduisant aux dérivés de fluorescéine.

VII.1.b.iii Formation de régioisomères

La première étape du mécanisme de cyclisation précédemment décrite, conduisant à l'intermédiaire **A**, détermine la position des substituants R_{1-4} et R_{2-3} des dérivés de fluorescéine. En effet, dépendant de la nature du groupement porté par les anhydrides monosubstitués, un seul régioisomère (**LSP7-1076**) (**Schéma VII-7 A**) ou un mélange de deux régioisomères ont été obtenus (**LSP7-1030**, **LSP7-1029**, **LSP7-1062**, **LSP7-1065**) (**Schéma VII-7 B**).

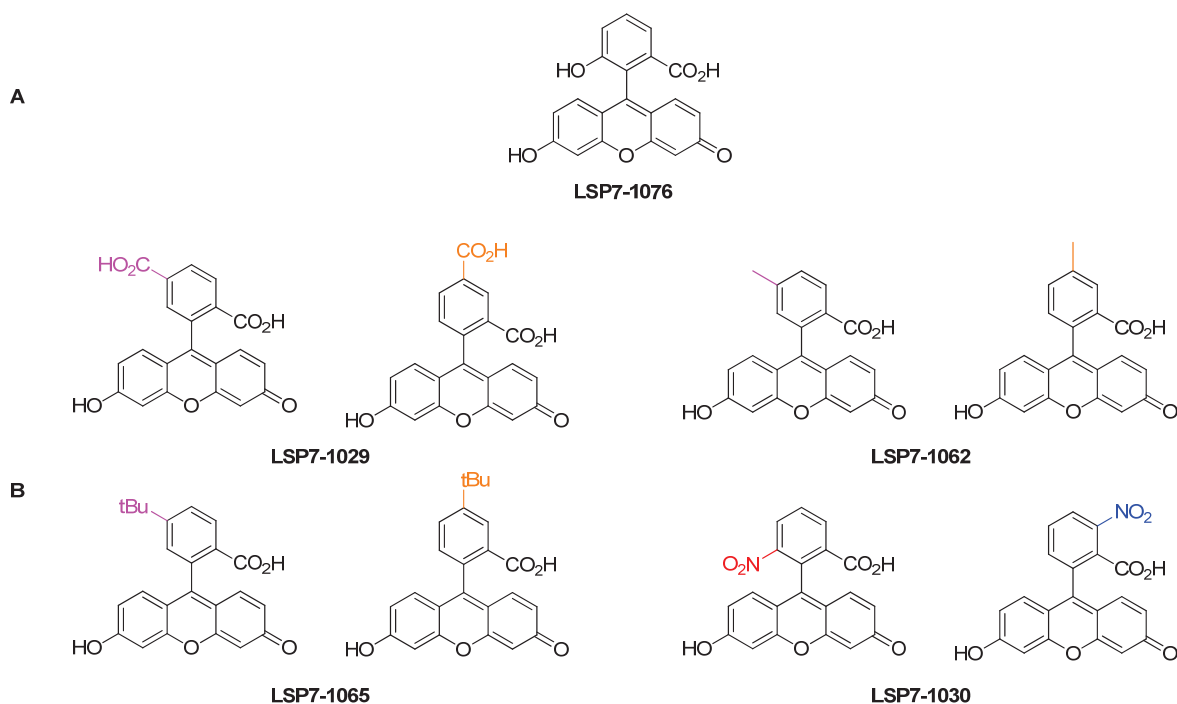
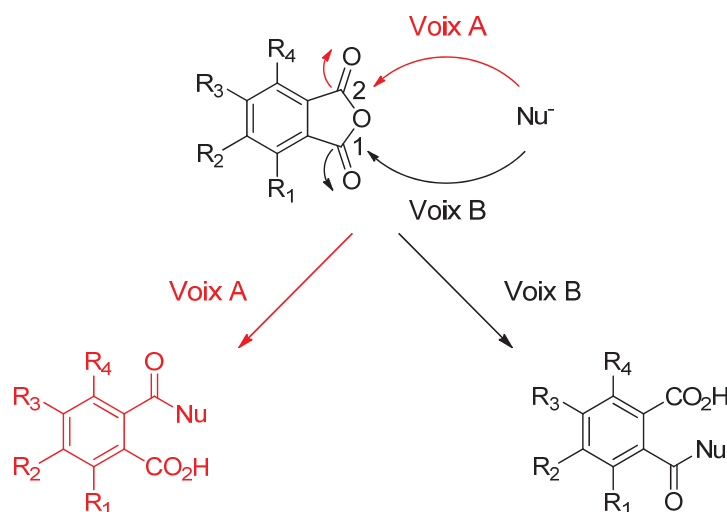


Schéma VII-7 : Structures des composés LSP7-1076, LSP7-1030, LSP7-1029, LSP7-1062 et LSP7-1065

La première attaque du résorcinol sur l'anhydride phtalique activé se réalise majoritairement sur le carbone le plus électrophile. Cependant, pour les composés **LSP7-1030**, **LSP7-1029**, **LSP7-1062** et **LSP7-1065**, il semblerait que les deux fonctions carbonyles de l'anhydride possèdent une électrophilie très similaire puisqu'un mélange de deux régioisomères a été obtenu.³⁷² Ainsi, une étude de RMN ^{13}C a été menée afin d'évaluer les déplacements chimiques de ces carbones et d'appréhender leur caractère électrophile (**Tableau VII-2**).

Tableau VII-2 : Déplacements chimiques ^{13}C des carbones caractéristiques des anhydrides phtaliques utilisés



| Produit final après condensation | Déplacement chimique (en ppm) | | | |
|--|-------------------------------|---|----------------|----------------|
| | R ₁ | R ₂ | C ₁ | C ₂ |
| LSP9-1014 | H | H | 170,6 | 170,6 |
| LSP7-1030 | NO ₂ | H | 166,9 | 166,7 |
| LSP7-1029 | H | CO ₂ H :165,4 | 163,1 | 163,0 |
| LSP7-1076 | OH | H | 164,3 | 161,9 |
| LSP7-1062 | H | CH ₃ : 21,8 | 163,3 | 163,4 |
| LSP7-1065 | H | C(CH ₃) ₃ : -C: 32,6 -CH ₃ : 37,6 | 163,6 | 163,4 |

Les deux carbones de la fonction anhydride possèdent des déplacements chimiques proches voir identiques pour cinq des six anhydrides phtaliques évalués. En effet, un écart maximal de 0,2 ppm a pu être observé pour les carbones C₁ et C₂ de l'anhydride portant une fonction *ter*-butyle ou une fonction nitro. Cet écart est de 0,1 ppm dans le cas d'anhydrides portant une fonction méthyl ou un groupement acide carboxylique. Ainsi, l'attaque nucléophile du résorcinol sur les anhydrides conduisant aux composés **LSP7-1030**, **LSP7-1029**, **LSP7-1062** et **LSP7-1065** est équiprobable sur le carbone C₁ et C₂ et conduit à l'obtention d'un mélange de deux régioisomères.

Cette étude a permis de caractériser un écart de 2,4 ppm entre le carbone C₁ et C₂ de l'anhydride portant une fonction hydroxyle en β du carbone C₁. Cette différence entre les deux carbones permet

d'expliquer l'obtention d'un seul régioisomère du composé **LSP7-1076**. La nature désactivée du carbone C₁ s'explique par la présence d'une forme tautomérique et la formation d'un pseudocycle à six chaînons qui s'établit entre la fonction C=O et l'hydrogène en β (**Schéma VII-8**). Le carbone C₂ ne subissant pas cet équilibre tautomérique, il est alors plus électrophile. De plus, la chélation de ce motif par le chlorure de zinc renforce la désactivation du carbone C₁ conduisant à la réalisation de l'attaque nucléophile exclusivement sur le carbone C₂ et à l'obtention d'un seul régioisomère.

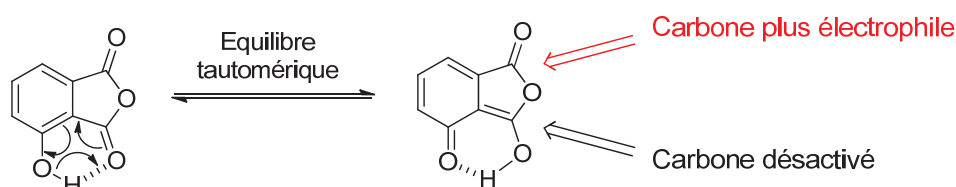


Schéma VII-8 : Equilibre tautomérique de l'anhydride 7-hydroxyphthalique

Cette étude RMN ¹³C a permis de caractériser qu'une différence inférieure à 2 ppm entre les carbones C₁ et C₂ des anhydrides phthaliques induit la formation de deux régioisomères de dérivés fluorescéine.

VII.1.b.iv Contrôle de l'asymétrie des dérivés de fluorescéine

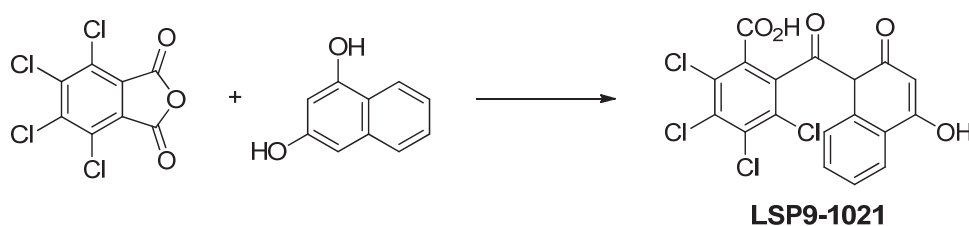
Comme mentionné précédemment, le mécanisme de formation des dérivés de fluorescéine fait intervenir deux étapes d'acylation de Friedel et Craft. Nous nous sommes alors proposés de confirmer le mécanisme de formation de ces fluorescéines en contrôlant la réaction d'acylation. De plus, le contrôle de l'acylation a permis l'accès à des dérivés de fluorescéine possédant un motif xanthène asymétrique.

➤ Synthèse d'un intermédiaire réactionnel

La première acylation permet de condenser un résorcinol sur un anhydride phthalique et de conduire à l'intermédiaire **A** (**Schéma VII-6**). Afin de pouvoir contrôler la réaction, un résorcinol encombré, le naphtorésorcinol, a été choisi pour être condensé sur l'anhydride tetrachlorophthalique. Dans le but de s'assurer de l'obtention de l'intermédiaire de synthèse, un équivalent de naphtorésorcinol est mis en présence d'un équivalent d'anhydride tetrachlorophthalique. Différentes conditions de températures, de solvants et de catalyseurs ont été évaluées.^{370, 373}

Les différentes conditions testées sont résumées dans le **Tableau VII-3**.

Tableau VII-3 : Essais de synthèse d'intermédiaire A



| Entrée | Catalyseur | Solvant | Température de chauffage | Temps | Rendement |
|--------|---------------------------|--------------|--------------------------|-------|------------------|
| 1 | ZnCl ₂ 0,3 eq. | pur | 190°C | 16 h | 0 % ^a |
| 2 | ZnCl ₂ 1,1 eq. | pur | 190°C | 16 h | 0 % ^a |
| 3 | ZnCl ₂ 0,3 eq. | MeOH | 80°C | 16 h | 0 % ^a |
| 4 | ZnCl ₂ 1,1 eq. | MeOH | 80°C | 16 h | 0 % ^a |
| 5 | ZnCl ₂ 2,2 eq. | MeOH | 80°C | 16 h | 0 % ^a |
| 6 | AlCl ₃ 2,2 eq. | Nitrobenzène | 190°C | 16 h | 17 % |
| 7 | AlCl ₃ 2,2 eq. | Nitrobenzène | 190°C | 24 h | 17 % |
| 8 | AlCl ₃ 4,4 eq. | Nitrobenzène | 190°C | 16 h | 95 % |

^a : Pas de réaction

Que ce soit dans le méthanol à 80°C ou sans solvant en présence de différentes quantités de ZnCl₂ à 190°C sans solvant, aucune réaction n'a lieu. Il apparaît alors que la catalyse par chlorure de zinc n'est pas efficace.

Dans la littérature, un ordre préférentiel de réactivité des différents acides de Lewis a été décrit (**Figure VII-1**).³⁹¹⁻³⁹³



Figure VII-1 : Réactivité décroissante de différents acides de Lewis

Une catalyse au chlorure de zinc ne permet pas l'accès au composé désiré. Ainsi, le chlorure d'aluminium, décrit comme étant le plus réactif, a été retenu. Afin de se rapprocher des conditions

391. Susz, B. P., *et al. Helv. Chim. Acta.* **1958**, 41, 1332-1341.

392. Yus, M., *et al. Tetrahedron.* **2001**, 57, 5799-5805.

393. Olah, G. A., *et al. Hydrocarbon Chemistry.* **2003**.

d'acylation permettant l'accès aux fluorescéines, un solvant à haut point d'ébullition, le nitrobenzène, a été sélectionné.

Ainsi, en présence de 2,2 équivalents d' AlCl_3 et après 16 heures de réaction à 190°C , le composé **LSP9-1021** a été isolé avec 17 % de rendement. Le temps de réaction porté à 24 heures n'apporte pas d'augmentation de ce dernier. Par contre, avec 4,4 équivalents de chlorure d'aluminium et 16 heures de réaction, le rendement du composé **LSP9-1021** est de 95 %.

Au regard de ces résultats, il semblerait que l'encombrement stérique des substituants du résorcinol a un effet sur la réactivité de l'acylation. La présence d'un groupement volumineux empêche la réaction de se faire avec du chlorure de zinc. Ainsi, cet acide de Lewis n'est pas assez fort pour réussir à amorcer la réaction.

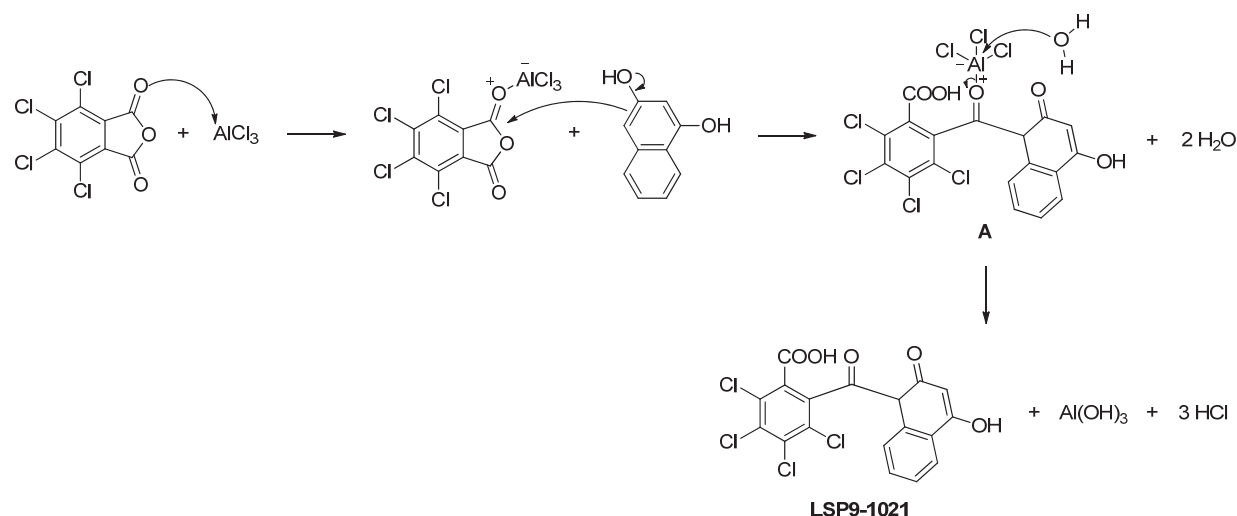


Schéma VII-9 : Mécanisme proposé d'activation de l'anhydride par l' AlCl_3

Le chlorure d'aluminium, quant à lui, va établir une liaison covalente avec un oxygène de l'anhydride renforçant ainsi le caractère électrophile du carbone le portant. Le naphtorésorcinol, espèce nucléophile, peut alors attaquer ce carbone. Une molécule d'eau est ensuite nécessaire pour rompre la liaison oxygène-aluminium et former du trioxyde d'aluminium (**Schéma VII-9**).

L'accès au composé **LSP9-1021** confirme alors que le mécanisme d'acylation passe un intermédiaire de type **A** présentant une fonction cétone. Cet intermédiaire est favorisé par l'action d'un acide de Lewis.

De la même manière que Santini *et al.* ont pu l'observer, l'encombrement stérique des molécules a une influence néfaste sur la réalisation de l'acylation et nécessite l'utilisation d'acide de Lewis plus fort.³⁹⁴

➤ Accès aux dérivés fluorescéines symétriques et asymétriques

L'accès à l'intermédiaire d'acylation ouvre alors de nouvelles perspectives en termes de fonctionnalisation du motif xanthène et notamment en asymétrisant ce motif.

394. Santini, C. C., *et al.* *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 467-469.

La deuxième étape d'acylation a été réalisée avec du chlorure de zinc. Comme décrit précédemment, l'obtention du composé **LSP9-1021** n'est pas possible en présence de cet acide de Lewis et d'un résorcinol stériquement volumineux. Pourtant, les composés **LSP9-1022** et **LSP9-1032** ont été obtenus avec des rendements respectifs de 30 % et 63 % par catalyse au chlorure de zinc (**Schéma VII-10**).

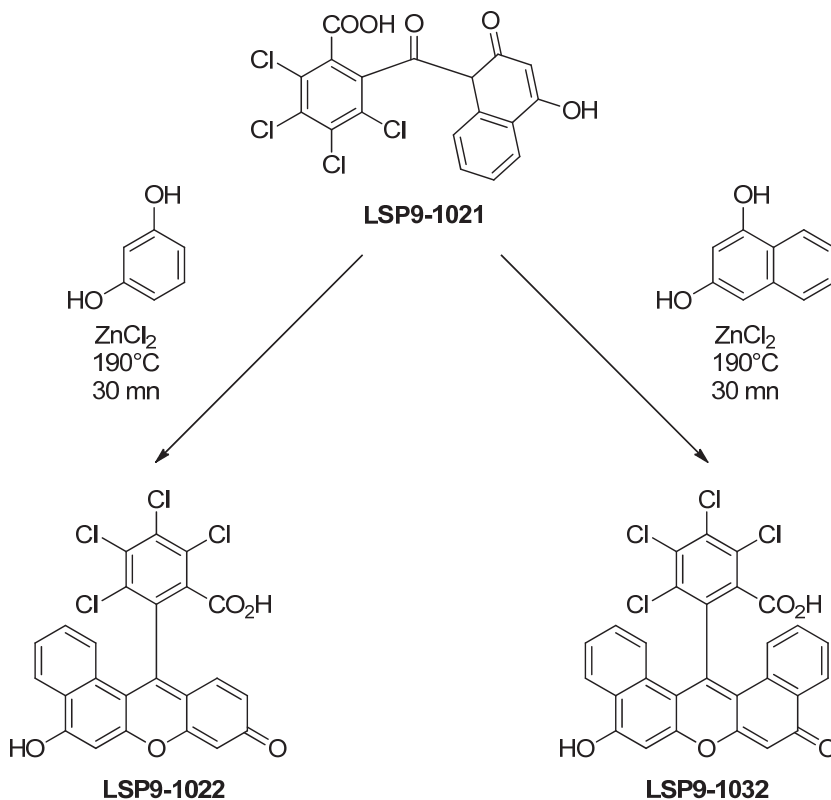


Schéma VII-10 : Voies de synthèse d'accès aux composés LSP9-1022 et LSP9-1032

La différence de réactivité entre l'anhydride tétrachlorophthalique et le composé **LSP9-1021** vis-à-vis de la réaction de condensation peut s'expliquer par la différence d'électrophilie des carbones. En effet, le carbone d'une cétone est plus électrophile que les carbones portant les oxygènes de la fonction anhydride. Cette différence est due à la délocalisation des électrons π entre les atomes de la fonction anhydride. Cette différence d'électrophilie est confirmée en RMN ^{13}C . La valeur du déplacement chimique de la cétone est de l'ordre de 200 ppm alors que les carbones portant les oxygènes de l'anhydride ont été mesurés à 158,5 ppm.³⁹⁵ La cétone du composé **LSP9-1021** étant plus électrophile, un acide de Lewis tel que le ZnCl_2 moins fort que le chlorure d'aluminium suffit à la réalisation de la réaction.

L'utilisation d'un groupement volumineux tel que le naphtrésorcinol permet de rigidifier la structure de ces composés notamment en bloquant la libre rotation autour de la liaison carbone-carbone entre le cycle phényle et le motif xanthène. Ainsi, le cycle phényle se trouve être bloqué perpendiculairement au plan du motif xanthène dans le composé **LSP9-1032** (**Figure VII-2**).

395. Fulmer, G. R., *et al. Organometallics*. **2010**, 29, 2176-2179.

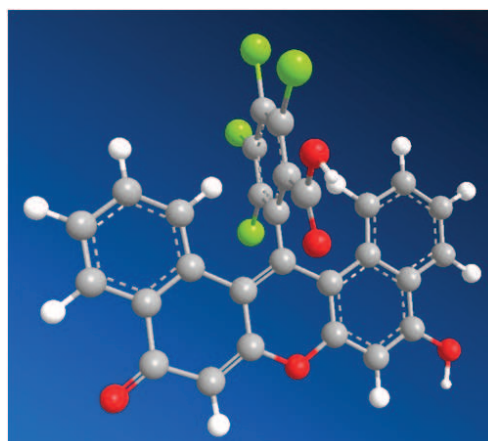


Figure VII-2 : Structure tridimensionnel du composé LSP9-1032

Le contrôle des étapes d'acylation, lors de la formation des fluorescéines, permet le développement de motifs xanthènes symétriques ou asymétriques. Ceci ouvre alors la voie au développement de nouveaux analogues de la fluorescéine.

➤ Conclusions

L'évaluation des voies de synthèse décrites dans la littérature a permis de caractériser l'utilisation d'une catalyse par acide de Lewis comme étant la méthode la plus robuste et la plus simple d'accès aux dérivés de fluorescéine. Ainsi, douze nouveaux composés ont été obtenus avec des rendements allant de 36 à 98 %.

Le mécanisme d'acylation multiple et successif de type Friedel et Craft a pu être confirmé et validé *via* la formation de l'intermédiaire **A** de cyclisation (**Schéma VII-6**). De plus, outre le fait que la formation de cet intermédiaire soit l'étape limitante de la synthèse de dérivés de fluorescéine, il ouvre de nouvelles perspectives de fonctionnalisation du motif xanthène.

VII.1.b.v Iodation du motif xanthène

La dernière étape permettant d'accéder à des analogues de Rose Bengale consiste à introduire des atomes d'iodes sur le motif xanthène. Un nombre important de réactions d'iodation ont été décrites. Le plus souvent ces méthodologies sont difficiles à mettre en œuvre à cause de l'utilisation de métaux lourds et de la sensibilité des cycles aromatiques. De plus, l'introduction d'atomes d'iode sur un composé aromatique nécessite la présence d'un agent permettant d'augmenter la réactivité de ces halogènes. Ainsi, deux méthodologies ont été sélectionnées et évaluées pour l'étape d'iodation des dérivés de fluorescéine.^{396, 397}

396. Shi, J. M., *et al. J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4418-4421.

397. Hoult, J. R. *Drugs.* **1986**, 32 Suppl 1, 18-26.

➤ Iodation de la fluorescéine

Chloramine T et iodure de sodium

La chloramine T est connue pour son utilisation comme désinfectant et bactéricide. Ses propriétés antibactériennes sont dues au fait que c'est un agent oxydant puissant.³⁸⁸

La fluorescéine, **LSP9-1014**, a été traitée par la chloramine T en présence d'iodure de sodium dans un mélange MeOH/AcOH (**Schéma VII-11**).

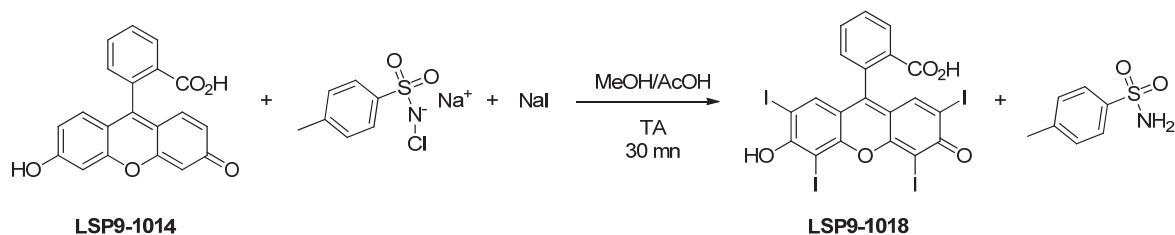


Schéma VII-11 : Iodation par l'iodure de sodium en présence de chloramine T

Cependant, après différents essais de purification infructueux, le *p*-toluènesulfonamide se complexe avec le composé **LSP9-1018**. Cette méthode d'iodation n'a alors pas été retenue.

Acide iodique et diiode

En s'inspirant du travail de Patil *et al.*, des conditions douces d'iodation du motif xanthène ont été testées.³⁸⁹

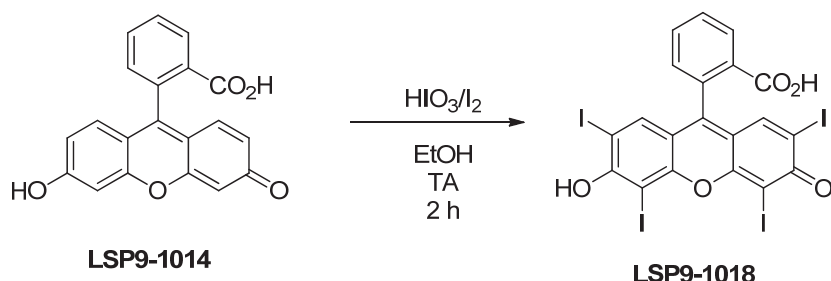


Schéma VII-12 : iodation par le diiode en présence d'acide iodique

Le composé **LSP9-1014** est traité par de l'acide iodique en présence de diiode dans l'éthanol à température ambiante pendant deux heures. Cette méthodologie de synthèse a permis l'accès à la fluorescéine portant quatre atomes d'iode sur son motif xanthène (**LSP9-1018**) avec un rendement de 60% (**Schéma VII-12**).

Le diiode est un composé peu réactif qui nécessite d'être activé. L'acide iodique permet de polariser la liaison entre les deux atomes d'iode.³⁸⁹ La déficience électronique sur un de ces atomes tend à le rendre électropositif. Ainsi, par réaction de substitution électrophile aromatique (SE_{Ar}) le motif xanthène est iodé sur les positions en *ortho* de l'alcool et de la cétone. La substitution en *ortho* de la cétone du motif xanthène s'explique par la présence d'un équilibre céto-énolique (**Schéma VII-13**).

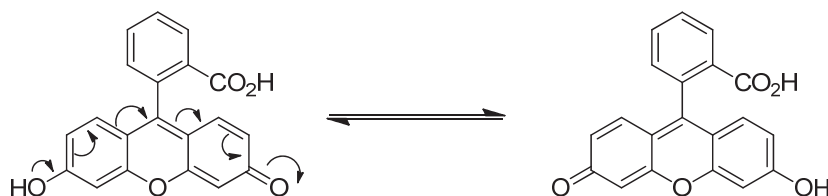


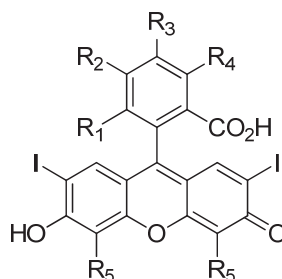
Schéma VII-13 : Equilibre céto-énolique du motif xanthène

En effet, il existe une délocalisation permanente des électrons π du cycle xanthène. Les fonctions cétone et phénol n'existent alors que transitoirement. Ainsi, l'halogénéation du motif xanthène se fait sur ces quatre positions.

Cette voie de synthèse présente l'avantage non négligeable de faire précipiter les produits iodés que sont les analogues de Rose Bengale. De plus, aucune halogénéation parasite n'a pu être caractérisée par spectrométrie de masse.

➤ Iodation des analogues de fluorescéine

Tableau VII-4 : Résultats des réactions d'iodation



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | Rendements |
|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------|-------------------|------------|
| LSP9-1018 | H | H | H | H | I | 60 % |
| LSP9-1019 | Cl | Cl | Cl | Cl | I | 35 % |
| LSP7-1069 | Cl | H | H | Cl | I | 49 % |
| LSP7-1074 | H | Cl | Cl | H | I | 48 % |
| LSP7-1066 | F | F | F | F | I | 56 % |
| LSP9-1026 | Br | Br | Br | Br | I | 30 % |
| LSP7-1050 | H | H | H | H | CH ₃ | 37 % |
| LSP7-1047 ^a | NO ₂ /H | H | H | H | H/NO ₂ | 45 % |
| LSP7-1055 ^a | H | H/COOH | COOH/H | H | I | 56 % |
| LSP7-1077 | OH | H | H | H | I | 21 % |
| LSP7-1070 ^a | H | CH ₃ /H | H/CH ₃ | H | I | 43 % |
| LSP7-1068 ^a | H | tBu/H | H/tBu | H | I | 39 % |

^a : Mélange de régioisomères

Cette méthodologie d'halogénéation douce a alors été appliquée aux différents dérivés de fluorescéine permettant l'accès à des analogues de Rose Bengale avec des rendements de 21 % à 60 %. Les résultats de ces réactions d'iodation sont résumés dans le **Tableau VII-4**.

VII.1.c Les analogues du Rose Bengale : un équilibre pH-dépendant

VII.1.c.i Introduction

De par leur utilisation en biologie et principalement en tant que fluorophore, les dérivés de fluorescéine ont été largement décrits et leurs inconvénients analysés en détail. Notamment, leur instabilité vis-à-vis des lumières intenses provoque un *photobleaching*, phénomène irréversible conduisant à une diminution du signal de fluorescence.^{398, 399}

Les analogues de fluorescéine possèdent deux fonctions ionisables, une fonction alcool sur le motif xanthène et une fonction acide carboxylique sur le cycle phényle. Ces molécules peuvent alors potentiellement exister sous trois états de protonation différents minimum. Ceci implique donc que les propriétés spectrales d'absorption ou d'émission soient très dépendantes du pH.

Markuszewski *et al.* ont pu constater qu'à l'état solide la fluorescéine existe sous trois couleurs. Un solide incolore, un de couleur jaune-orangé et l'autre de couleur rouge. Des études de cristallographie réalisées sur ces solides ont permis de montrer que la fluorescéine sous forme lactone est incolore, que c'est un anion de cette molécule qui est jaune-orangé et que la forme neutre est de couleur rouge (**Schéma VII-14**).³⁶³

De ce fait, un point clé serait d'identifier quelle est la forme prépondérante, lactone ou acide carboxylique, des dérivés de fluorescéine à pH 7,2. Ce pH correspondant aux conditions biologiques d'évaluation des molécules.

VII.1.c.ii Les différents états de protonation des analogues de fluorescéine

Un équilibre tautomérique entre une forme carboxylique, dite ouverte, et une forme lactone, dite fermée, existe chez les analogues de fluorescéine (**Schéma VII-14**).

Afin d'obtenir de plus amples informations structurales, une étude par RMN ¹³C des différentes formes tautomériques a été réalisée par Anthoni *et al.*³⁶⁴ Ce travail a permis de caractériser les déplacements chimiques des carbones des différentes formes (lactone, monoanionique et quinone) et donc d'éclaircir les ambiguïtés sur les différentes formes de fluorescéines. Les résultats de ces travaux sont résumés dans le **Tableau VII-5**.

398. Zakrzewski, A., *et al. Tetrahedron*. **1987**, 43, 4507-4512.

399. Saylor, J. *Exp. Fluids*. **1995**, 18, 445-447.

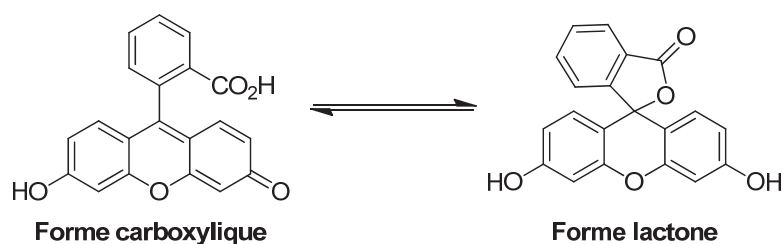
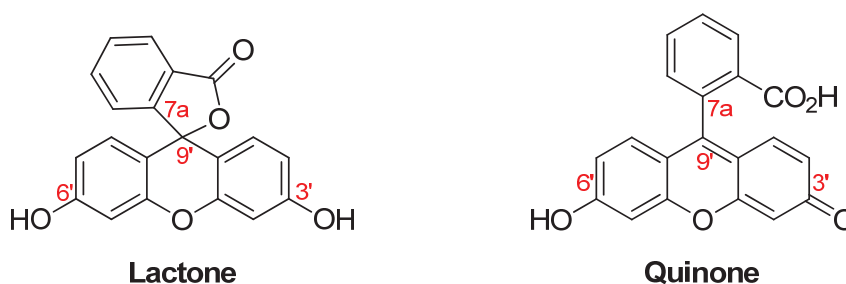


Schéma VII-14 : Equilibre tautomérique de la fluorescéine

Tableau VII-5 : Déplacements chimiques des carbones caractéristiques de fluorescéine dans le DMSO-d6 (en ppm)



| Fluorescéine | Xanthène $C_{3'}-C_{6'}$ | Xanthène $C_{9'}$ | Phényle C_{7a} |
|----------------|-----------------------------|----------------------|---------------------|
| Lactone | 158,8 | 85,4 | 151,0 |
| Quinone | 179,8 | 158,0 | 134,8 |

Cette étude RMN a permis de caractériser quatre déplacements chimiques caractéristiques correspondant aux carbones $C_{3'}-C_{6'}$, $C_{9'}$ et C_{7a} . Déplacements qui sont d'ailleurs caractéristiques des différentes formes.

- $C_{3'}-C_{6'}$. Il existe une différence de 20 ppm entre la lactone et la quinone, respectivement dues à la présence de la fonction cétone de la quinone.
- $C_{9'}$. Dans le cas de la lactone, le $C_{9'}$ porte le cycle phényle ainsi que la fonction ester cyclique. Dans le cas de la quinone le carbone est de type sp^2 alors qu'il est sp^3 dans la forme lactone.
- C_{7a} . Il est possible d'observer une différence de 20 ppm entre les formes quinone et la lactone. Dans ce cas, le carbone C_{7a} est déblindé à cause de sa participation dans le cycle formé par la lactone.

Ces informations apportent des précisions quant à la structure de la fluorescéine, mais pas sur le point essentiel qu'est l'équilibre qui s'établit entre ces différentes formes en fonction du pH.

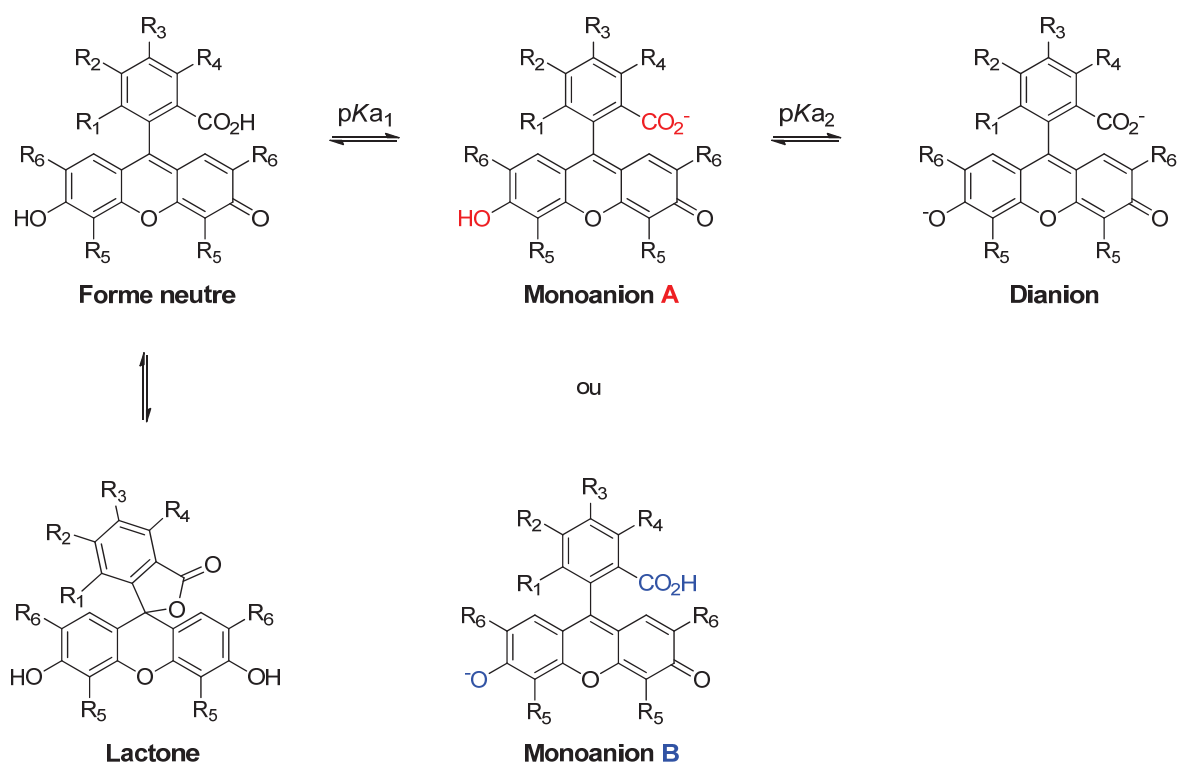


Schéma VII-15 : Etats de protonation des tautomères en fonction du pH

La présence de deux fonctions ionisables sur les dérivés de fluorescéine impose l'existence de quatre états de protonation : (Schéma VII-15)

- forme neutre,
- monoanion A,
- monoanion B,
- dianion.

La valeur des constantes d'acidité de la fluorescéine a été rapportée par Sun *et al.*³⁶⁹ Le pK_{a2} de 6,43, correspondant au pK_a de la fonction phénol du motif xanthène. Cependant, cette valeur est influencée par les substituants R_5 et R_6 portés par ce motif chez les analogues de fluorescéine. Un groupement mésomère donneur ou inductif donneur en position R_5 et R_6 tendra à augmenter cette valeur par stabilisation de la liaison oxygène-hydrogène de la fonction alcool. Par contre, les groupements électroattracteurs vont provoquer une fragilisation de cette liaison et ainsi diminuer la valeur de ce pK_a . Ainsi, si la valeur de pK_{a2} est fortement diminuée par les substituants du motif xanthène et devient inférieure à pK_{a1} , il y a alors formation du monoanion B, c'est-à-dire le phénolate.

A *contrario*, il semblerait que la présence du cycle phényle n'a qu'une faible influence sur ce pK_a . En effet, dans une étude récente, Šebej *et al.* ont mesuré un pK_a de 6,3 pour le groupement phénol d'un motif xanthène possédant un substituant méthyle à la place du cycle phényle (**Schéma VII-16**).⁴⁰⁰

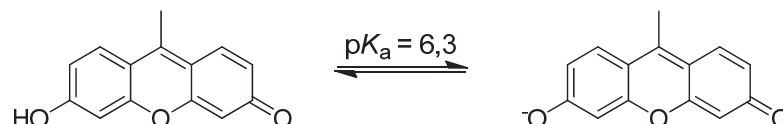


Schéma VII-16 : Evaluation du pK_a de la fonction hydroxyle du motif xanthène

Cette étude indique que la présence d'un cycle phényle, et a *fortiori* de ses substituants, a un effet limité sur la valeur de la constante d'acidité du groupement phénol porté par le motif xanthène.

D'autre part, la valeur mesurée du pK_{a1} de l'acide carboxylique porté par le cycle phényle est de 4,31.³⁶⁹ Cette valeur est fortement corrélée à la nature des substituants R_1 , R_2 , R_3 et R_4 .

Selon plusieurs auteurs, la lactone ne pourrait se former qu'à partir de la forme neutre et non à partir des formes chargées (monanioniques ou dianion) (**Schéma VII-15**).^{369, 401, 402} Ainsi, il semblerait qu'à pH physiologique les analogues de fluorescéine, à cause de la déprotonation de la fonction acide carboxylique (pK_{a1}) et de celle du phénol (pK_{a2}), soient sous la forme dianionique.

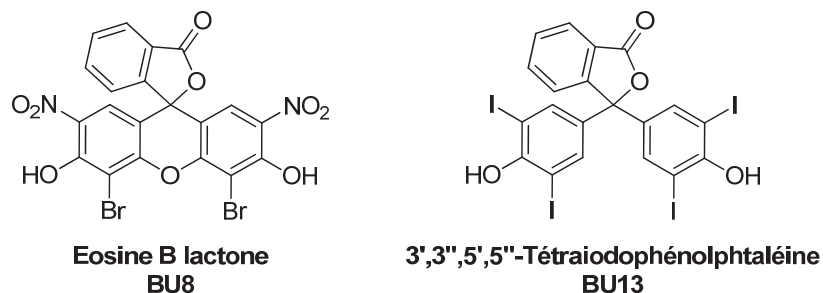


Figure VII-3 : Structures des composés BU8 et BU13 en forme lactone

Cependant des exceptions ont été décrites dans la littérature.⁴⁰³⁻⁴⁰⁵ Ainsi, un analogue de la fluorescéine, l'éosine B lactone (**BU8**), est exclusivement sous forme lactone à pH physiologique. Cette molécule possède en position R_5 un brome et en position R_6 un groupement nitro qui est mésomère attracteur. La mésomérie induite par ce groupement va empêcher l'ouverture de la lactone. Certains dérivés de phénolphtaléine sont aussi sous forme lactone à pH neutre (**BU13**) (**Figure VII-3**).

Les analogues de fluorescéine peuvent alors exister sous quatre états de protonation. De plus, il existe un équilibre entre une forme lactone et une forme quinone. Même si à pH physiologique les composés de types fluorescéine sont sous forme anionique, une incertitude réside entre une forme carboxylique ouverte et une forme fermée lactone.

400. Šebej, P., *et al. J. Org. Chem.* **2012**.

401. Klonis, N., *et al. Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 179-85.

402. Li, S.-C., *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 132, 64-66.

403. Tamura, Z., *et al. Anal. Sci.* **1999**, 15, 339-342.

404. Brenzovich Jr, W. E., *et al. Dyes Pigments.* **2003**, 59, 251-261.

405. McHedlov-Petrosyan, N. O., *et al. Spectrochim. Acta A.* **2005**, 61, 2747-2760.

VII.1.c.iii Blocage du Rose Bengale sous forme lactone ou sous forme acide

Les propriétés spectrales du Rose Bengale et du Rose Bengale lactone sont connues et décrites comme différentes. Pourtant, le spectre UV-visible de la lactone obtenu en solution tamponnée à pH 7,2 est identique à celui de la forme acide.

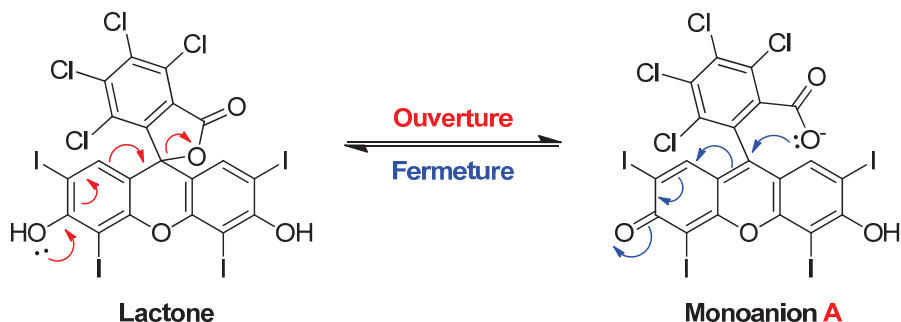


Schéma VII-17 : Mécanisme d'ouverture et de fermeture du Rose Bengale

Ainsi, il semblerait que la forme lactone se soit ouverte et conduise à la forme acide (**Schéma VII-17**).

Afin de figer les formes lactone, dite « fermées », et acide, dite « ouvertes », deux composés ont été envisagés. L'éther du Rose Bengale lactone dans lequel les fonctions ont été alkylées et le Rose Bengale ester dans lequel la fonction carboxylique est estérifiée (**Figure VII-4**).

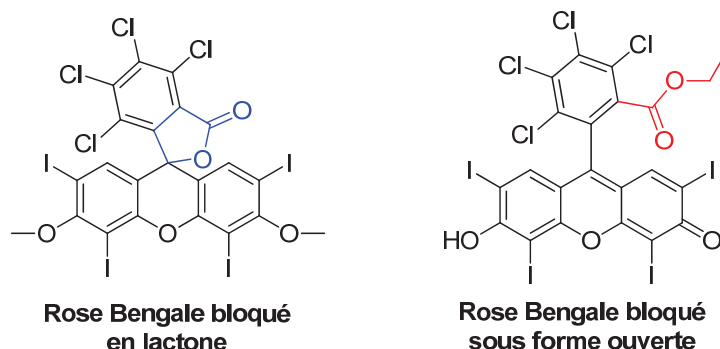


Figure VII-4 : Blocage du Rose Bengale en forme « fermée » et en forme « ouverte »

➤ Ethérification du Rose Bengale

Pour éviter l'ouverture du Rose Bengale lactone, nous nous sommes donc proposés d'éthérifier les deux fonctions phénoliques du cycle xanthène.⁸¹

La réaction de Mitsunobu a été sélectionnée pour ses conditions douces afin de ne pas ouvrir la lactone lors de la déprotonation du phénol.^{406, 407} Cette réaction, de substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2), a été réalisée en présence de triphénylphosphine, de diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) et d'un nucléophile

406. Olofsson, B., et al. *Tetrahedron*. **2002**, 58, 5979-5982.

407. Lepore, S. D., et al. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8261-8263.

qu'est le terbutanol.^{408, 409} Cependant, aucune étherification ne s'est réalisée sur le Rose Bengale lactone (**Schéma VII-18**).

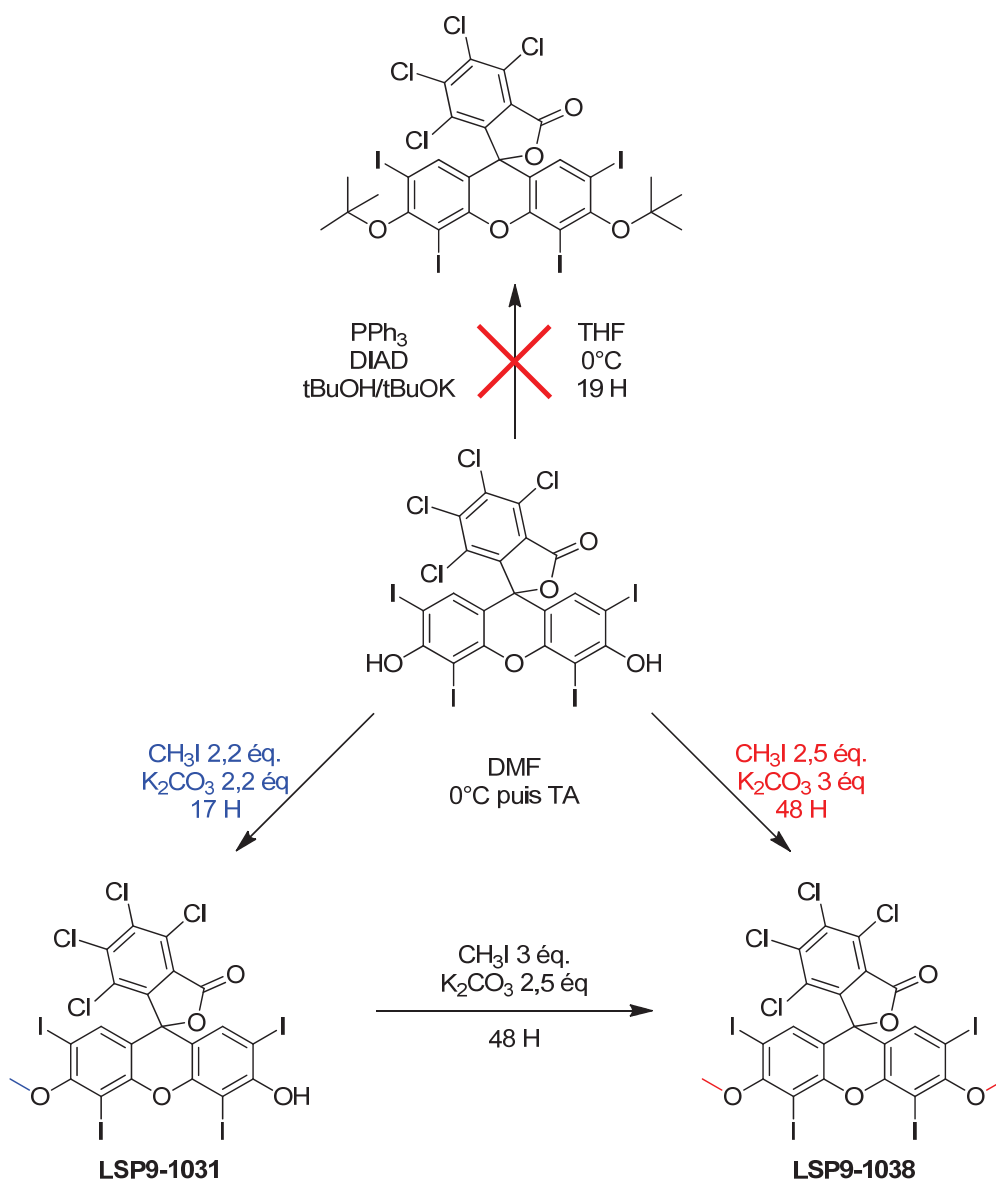


Schéma VII-18 : Voies de synthèse du Rose Bengale mono- et di-éther

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet échec. Tout d'abord, l'équilibre tautomérique lactone-quinone qui, sous l'action d'une base arrachant un proton phénolique, va favoriser le déplacement de cet équilibre vers la forme ouverte de la lactone. De plus, les pK_a des couples phénol/phénolate portés par un motif xanthène sont de l'ordre de 6,5. Ainsi, la bétaine de Morrison–Brunn–Huisgen générée par l'action de la triphénylphosphine sur le DIAD n'est peut-être pas assez basique pour arracher le proton phénolique.⁴¹⁰

408. Mitsunobu, O., *et al. Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, 40, 2380-2382.

409. Mitsunobu, O. *Synthesis*. **1981**, 1981, 1-28.

410. But, T. Y., *et al. Chem. Asian J.* **2007**, 2, 1340-55.

La réaction de Mitsunobu n'ayant permis d'obtenir les composés désirés, une étherification par l'iodure de méthyle a été réalisée (**Schéma VII-18**). Les résultats des essais réalisés sont résumés dans le **Tableau VII-6**.

Tableau VII-6 : Résultats des étherifications par l'iodure de méthyle

| Composé | Réactif | K ₂ CO ₃ | CH ₃ I | Temps | Résultats |
|------------------|------------------|--------------------------------|-------------------|-------|-------------------|
| LSP9-1036 | RBL | 0 éq. | 2,2 éq. | 56 H | 0 % ^a |
| LSP9-1031 | RBL | 2,2 éq. | 2,2 éq. | 17 H | Monoéther 24 % |
| LSP9-1038 | LSP9-1031 | 2.5 éq. | 3 éq. | 48 H | Diéther 23 % |
| LSP9-1038 | RBL | 2,5 éq. | 3 éq. | 48 H | Diéther 50 % |
| LSP9-1135 | Eosine B | 2,5 éq. | 3 éq. | 48 H | Diéther 23 % |

^a : Pas de réaction
RBL : Rose Bengale lactone

La réaction d'étherification du Rose Bengale lactone en présence d'iodure de méthyl sans l'action d'une base ne se réalise pas. Par contre, en présence d'un faible excès de carbonate de potassium et d'agent alkylant, seulement une fonction phénol a pu être alkylée et conduire au monoéther de Rose Bengale lactone avec un rendement de 24 % (**LSP9-1031**). La RMN ¹H réalisée en présence de DMSO-d₆, solvant permettant de caractériser les protons échangeables, indique la présence d'un signal singulet caractéristique des fonctions phénols à 9 ppm. En effet, cette molécule **LSP9-1031** a été désymétrisée par l'alkylation d'un des phénols. Ainsi, les deux hydrogènes portés par le motif xanthène ont des déplacements chimiques proches mais différents de 0,06 ppm. La présence du méthyl de la fonction éther est confirmée par un signal singulet à 3,88. La fonction phénolique, qui n'a pu être étherifiée, est visible en RMN sous forme d'un signal large à 9,90 ppm. Ces différentes informations indiquent l'existence de la forme lactone. Cependant, le monoéther du Rose Bengale lactone présente toujours une fonction phénol qui est dépendante du pH et qui peut permettre l'ouverture de la lactone dans certaines conditions.

Afin d'obtenir le Rose Bengale lactone diétherifié, le composé **LSP9-1031** a dû être traité par un large excès d'iodure de méthyl et de carbonate potassium. Le Rose Bengale diéther (**LSP9-1038**) a été obtenu avec un rendement de 23 %. Le rendement global de cette réaction de diétherification en deux étapes est de 5 %.

Dans le but d'améliorer ce rendement, les conditions de diéthérification ont été optimisées pour obtenir le diéther en une seule étape. Ainsi, la réaction menée avec 2,5 équivalents de K_2CO_3 et de 3 équivalents d'iodure de méthyl a permis l'obtention du composé **LSP9-1038** avec un rendement de 50%.

L'éosine B lactone a été traitée dans des conditions similaires qui ont permis d'obtenir le diéther de l'éosine B lactone (**LSP9-1135**) avec un rendement de 23 % (**Figure VII-5**).

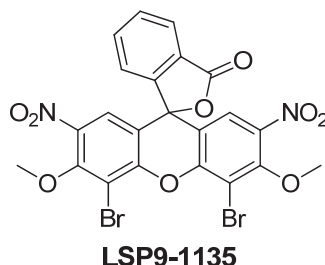


Figure VII-5 : Structure du diéther de l'éosine B lactone

La caractérisation des composés **LSP9-1038** et **LSP9-1135** a été réalisée de la même manière que le composé **LSP9-1031**. La spectrométrie de masse et l'analyse CLHP témoignent toutes deux de l'existence des composés diéthérifiés de façon pure, par la présence respective d'un pic de masse $[M+H]^+$ et d'un temps de rétention diminué de près de 7 minutes. La RMN 1H confirme la structure de ces composés par perte du signal phénolique vers 10 ppm.

Ainsi, deux structures d'analogues de fluorescéine, le Rose Bengale et l'éosine B, ont pu être obtenues sous forme lactone en bloquant les deux fonctions phénols impliquées dans l'ouverture de la lactone.

➤ Estérification du Rose Bengale

Dans la même optique que le blocage du Rose Bengale sous forme lactone, il a été envisagé d'estérifier la fonction acide carboxylique du cycle phényle. En effet comme indiqué précédemment, cette protection permet de figer le RB sous forme ouverte (**Schéma VII-19**).

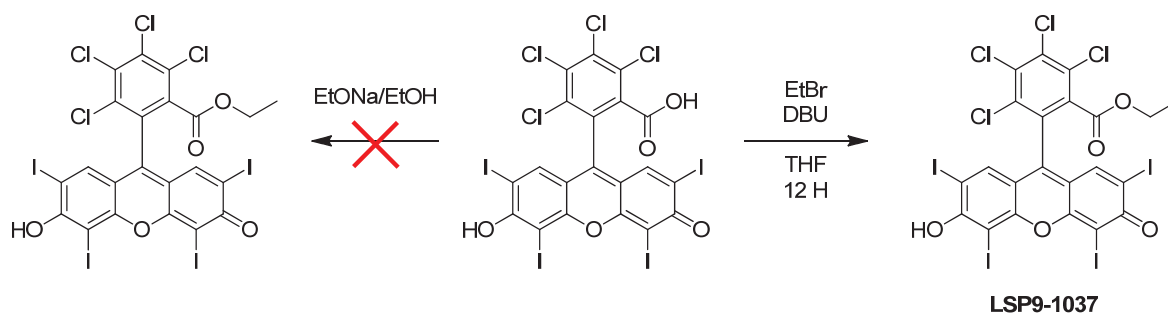


Schéma VII-19 : Voies de synthèse d'estérification du Rose Bengale

Afin d'obtenir l'ester désiré, le Rose Bengale a été traité par de l'éthanoate de sodium dans l'éthanol. Ces conditions n'ont pas permis d'obtenir l'ester éthylique du Rose Bengale. Cet échec est certainement imputable à l'éthanoate puisqu'il est meilleure base que nucléophile.

Une autre méthodologie a alors été explorée. Elle consiste, dans un premier temps, à déprotoner l'acide carboxylique du rose Bengale puis à faire réagir ce carboxylate sur un équivalent synthétique du carbocation éthyle (Et^+) par substitution nucléophile.

Pour mettre en œuvre cette réaction, la base retenue a été la DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en) pour son caractère non nucléophile et du bromoéthane comme électrophile.⁴¹¹

Les résultats des estérifications réalisées sont résumés dans le **Tableau VII-7**.

Tableau VII-7 : Résultats des essais d'estérification

| Composé | Réactif | EtO^- | DBU | EtBr | Solvant | Conditions | Rendements |
|------------------|-----------------|----------------|---------|---------|---------|-------------------------|------------------|
| LSP9-1024 | RB 1 éq. | 1 éq. | / | / | EtOH | -10°C Puis TA 6 H | 0 % ^a |
| LSP9-1037 | RB 1 éq. | / | 1 éq. | 1 éq. | THF | TA 12 H | 13 % |
| LSP9-1037 | RB 1 éq. | / | 1,8 éq. | 2,2 éq. | THF | 65°C 12 H | 27 % |
| LSP9-1138 | Eosine 1 éq. | / | 2,5 éq. | 2,5 éq. | THF | 65°C 48 H | 23 % |

^a : Pas de réaction

Comme il est possible de constater, au regard des informations décrites dans ce tableau, en présence d'un équivalent de DBU et de bromure d'éthyle la réaction est initiée et conduit à l'obtention de l'ester éthylique de Rose Bengale avec un faible rendement de 13 %. Ainsi il a été envisagé de se mettre en excès de base, d'EtBr et de chauffer au reflux du THF. Cette réaction a permis d'accéder au composé pur (**LSP1037**) avec un meilleur rendement de 27%.

Une réaction similaire a été réalisée avec l'éosine B en augmentant le temps de réaction à 48 heures. L'ester éthylique de l'éosine a été obtenu avec un rendement de 23 % dans ces conditions.

411. Shieh, W.-C., *et al. J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2188-2191.

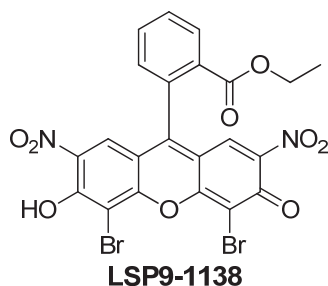


Figure VII-6 : Structure de l'ester éthylique de l'éosine B

Tout comme pour l'éthérification, les faibles rendements d'estérification des analogues de fluorescéine s'expliquent par l'équilibre lactone-quinone qui s'établit en présence d'une base. Ainsi, lorsque les dérivés de fluorescéine se trouvent sous forme fermée aucune estérification n'est réalisable. L'augmentation de la température du milieu réactionnel permet d'améliorer le rendement de la réaction. Par contre, aucune différence n'a pu être constatée entre 12 heures et 48 heures de réaction même en augmentant la quantité de base. Il est alors probable qu'une proportion importante de réactif se trouve sous forme lactone empêchant ainsi l'estérification de l'acide carboxylique.

➤ Décarboxylation de l'éosine B

Ayant pour objectif de déterminer la forme bioactive des dérivés de fluorescéine et afin que la lactone ne puisse se reformer, l'éosine B a également été décarboxylée. De plus, l'accès à ce type de composés permet de pouvoir appréhender l'implication de la fonction acide carboxylique sur l'activité biologique de ses analogues (**Schéma VII-20**).

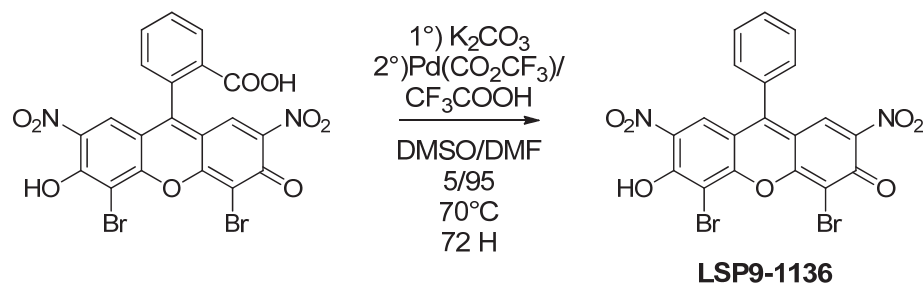


Schéma VII-20 : Décarboxylation de l'éosine B

En s'inspirant du travail de Dickstein *et al.*, une réaction de décarboxylation pallado-catalysée, au palladium(II) trifluoacétate, a été réalisée sur l'éosine B dans un mélange DMF/DMSO.⁴¹² Le composé **LSP9-1136** a été obtenu avec un rendement de 14%.

L'éosine B est tout d'abord traitée par du carbonate de potassium pour former un sel de potassium de l'acide carboxylique (**A**). Il s'en suit une coordination du palladium avec deux molécules de DMSO et le

412. Dickstein, J. S., *et al. Org. Lett.* **2007**, 9, 2441-2444.

carboxylate conduisant à la perte d'une molécule d'acide trifluoroacétique et à la formation de l'intermédiaire **B**. Un état de transition à quatre atomes (**C**) provoque le départ d'une molécule de dioxyde de carbone et permet au palladium de se lier au cycle aromatique en formant une espèce palladium aryle (**D**). Cet intermédiaire **D** subit une protonolyse qui conduit à la formation de l'éosine B décarboxylée et à la régénération du catalyseur le palladium(II) trifluoroacétate (**Schéma VII-21**).

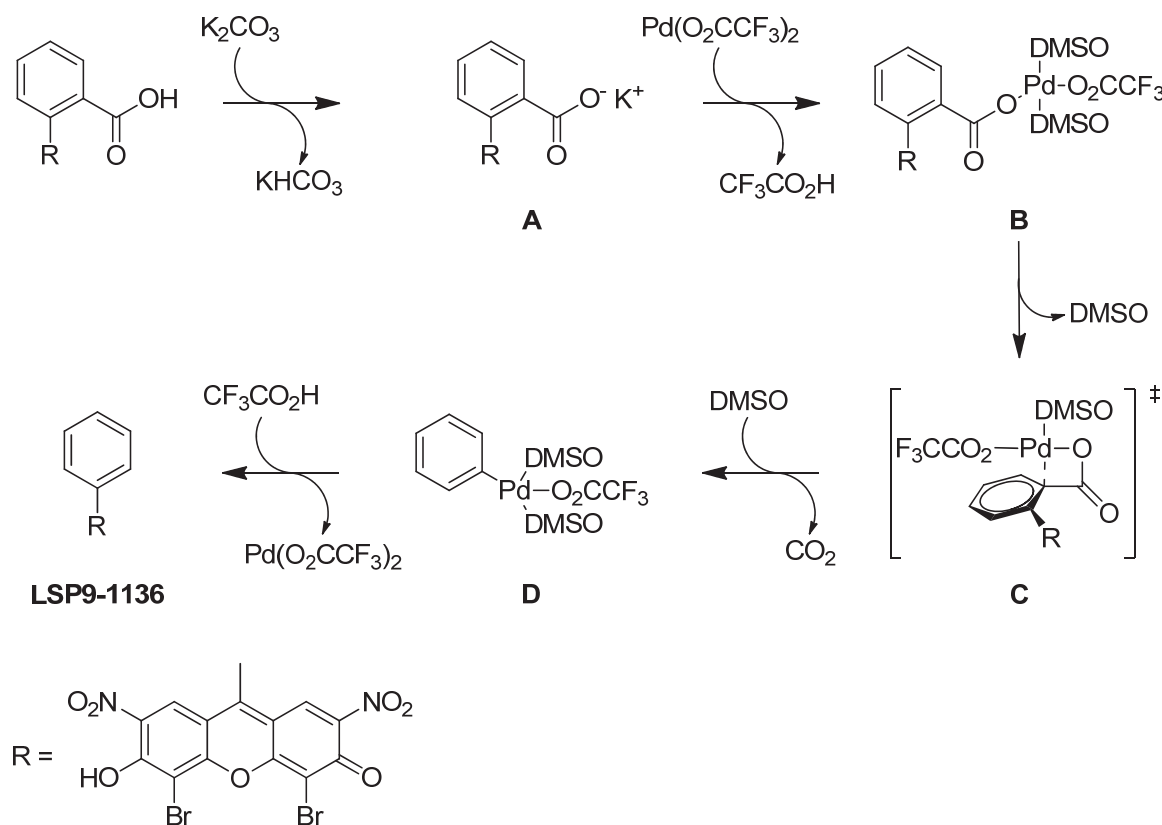


Schéma VII-21 : Mécanisme proposé de décarboxylation de l'éosine

VII.1.c.iv Détermination de la forme prédominante à pH physiologique

Les analogues de fluorescéine et de Rose Bengale, comme cela a été décrit précédemment, peuvent exister sous différents états de protonation et sous une forme quinone ou lactone. En vue de leur évaluation comme inhibiteurs du transport du glutamate et afin de déterminer quelle forme existe à pH physiologique, nous nous sommes proposés d'analyser ces composés par CLHP sur colonne C18 élués avec un gradient tampon/méthanol à pH 7,2.

Dans ces conditions, l'ester éthylique du Rose Bengale (**LSP9-1037**) possède un temps de rétention de 18,12 minutes.

A *contrario*, les composés bloqués sous forme lactone, **LSP9-1038** et **LSP9-1135**, possèdent des temps de rétention respectivement de 7,36 et 7,56 minutes. L'éosine B décarboxylée (**LSP9-1136**) est encore moins bien retenue avec un temps de rétention de 3,27 minutes.

Ainsi, les composés sous forme ouverte ont des temps de rétention d'environ 15 minutes alors que les composés cycliques, qui sont moins retenus, ont des temps de rétention compris entre 7 et 8 minutes.

Le Rose Bengale et le Rose Bengale lactone évalués dans les mêmes conditions, sont tous deux retenus de la même manière avec un temps de rétention de 15,80 minutes. Les différents analogues du Rose Bengale présentent, eux aussi, des temps de rétention compris entre 11,82 et 17,87 minutes.

Il apparaît alors, qu'à pH physiologique, les analogues de fluorescéine se trouvent sous une forme ouverte. L'équilibre tautomérique entre lactone et quinone étant complètement déplacé vers une forme anionique de ces colorants de type monoanion A ou monoanion B (**Figure VII-7**).

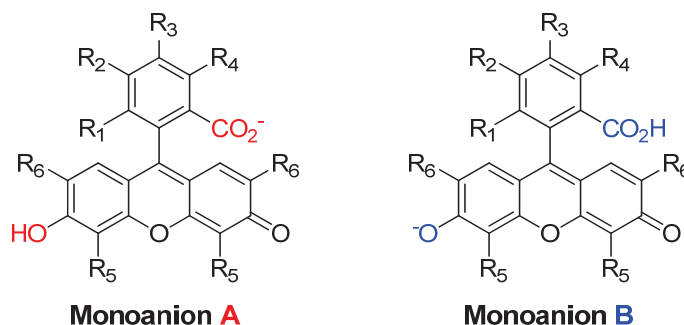


Figure VII-7 : Monoanion A ou Monoanion B, formes prédominantes à pH physiologique

VII.1.d Conclusions

La synthèse du Rose Bengale et des analogues de fluorescéine peut paraître aisée au regard de leur relative facilité de conception. Cependant, leur faible solubilité et les difficultés de caractérisation n'ont pas facilité le développement d'une série d'analogues de RB.

Ainsi, une méthodologie de synthèse robuste des dérivés de fluorescéine a été développée et a permis la synthèse de 12 composés. Lors de cette étude, le mécanisme de polycondensation de Friedel et Craft a été caractérisé et un intermédiaire de cyclisation isolé. Cet intermédiaire pouvant conduire à des fluorescéines asymétriques en utilisant deux molécules de phénols différentes.

Ces 12 analogues de fluorescéine ont été iodés pour conduire à l'obtention d'analogues du Rose Bengale. Une étude d'évaluation de la forme prédominante, en fonction du pH des dérivés de fluorescéine, a été permise par le développement de composés mimant ces analogues sous forme lactone et par la synthèse de mimes de fluorescéine sous forme ouverte. Ce travail a permis de conclure sur le fait que les dérivés de fluorescéine se trouvent sous forme monoanionique à pH physiologique.

La capacité d'inhibition sur l'activité de recapture du glutamate via leurs transporteurs a été évaluée, ainsi que leur sélectivité vis-à-vis d'autres transporteurs de neurotransmetteurs (**Paragraphe VIII.2**).

VII.2 Le Bleu Trypan et ses dérivés

VII.2.a Introduction

Les molécules possédant une liaison azo sont des composés très utilisés pour la synthèse de colorants, la formation d'initiateurs radicalaires ou en chimie thérapeutique. De plus, ces composés ont une place importante dans la chimie industrielle notamment textile ou informatique puisqu'ils entrent dans la composition de certains dispositifs électroniques. De par l'engouement que cette liaison génère, elle est au cœur de nombreuses études.

Plusieurs méthodes ont été décrites pour la synthèse de composés azo :

- par oxydation d'anilines,^{402, 413, 414}
- par réduction de composés nitroaromatiques,⁴¹⁵
- par couplage d'anilines et de nitrosoaryles (réaction de Mills),
- par oxydation de dérivés hydrazos,
- par réduction d'azoxybenzènes,⁴¹⁶
- par couplage sur un sel de diazonium électrophile.

Différentes oxydations d'anilines ont été décrites comme l'oxydation catalysée par des nanoparticules d'or sous pression de dioxygène ou par catalyse au bromure de cuivre dans la pyridine.^{417, 418}

En 2011, Zhang *et al.* ont décrit une méthode efficace d'oxydation d'aniline par des métaux appartenant aux terres rares.⁴¹⁹ Ainsi, en présence de nitrate d'yttrium, la formation de la liaison azo entre deux anilines est réalisée après 15 minutes dans le THF et 1 heure d'hydrogénation par l'air (**Schéma VII-22**). Cette méthodologie permet d'obtenir des rendements quasi quantitatifs lorsque les anilines sont substituées par des groupements inductifs ou mésomères donneurs.

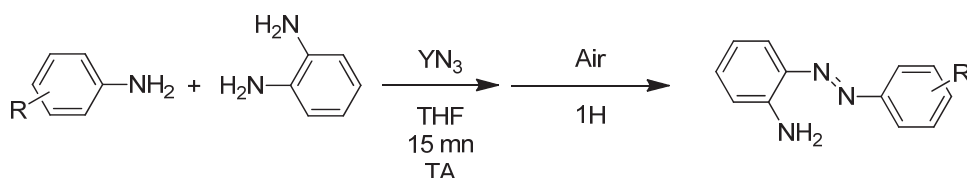


Schéma VII-22 : Formation de liaison azo par oxydation des métaux des terres rares

Une méthode, récemment décrite par Hu *et al.*, a permis la réduction douce de nitro-aryles *in situ*.⁴²⁰ Pour se faire, les nitros sont réduits par catalyse avec des nanofils de platine (Pt NWs) en présence

413. Goldstei, S., *et al. J. Org. Chem.* **1973**, 38, 183-185.

414. Corma, A., *et al. Science.* **2006**, 313, 332-334.

415. Biradar, A. V., *et al. Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3616-3619.

416. Hamon, F., *et al. Tetrahedron.* **2009**, 65, 10105-10123.

417. Grirrane, A., *et al. Science.* **2008**, 322, 1661-1664.

418. Zhang, C., *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6174-6177.

419. Zhang, L. J., *et al. Organometallics.* **2011**, 30, 375-378.

420. Hu, L., *et al. Chem. Commun.* **2012**, 48, 3445-3447.

d'hydroxyde de potassium suivie d'une étape d'hydrogénation (**Schéma VII-23**). Dans ces conditions, les azobenzènes sont obtenus avec des rendements proches de 90 %.

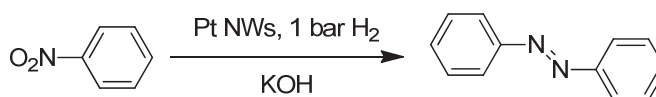


Schéma VII-23 : Synthèse d'azobenzène par réduction de nitroaryles

Dans la littérature, plusieurs méthodes de formation de liaison azo sont associées à des cyclisations ou des isomérisations en milieu acide ou basique.^{421, 422} De nos jours, l'hydrogénation par transfert de catalyse des composés organiques est décrite comme étant une méthodologie de choix.^{423, 424} Ce type de catalyse possède de nombreux avantages comparé aux méthodes de réduction ou d'hydrogénation catalytiques classiques. Elle permet notamment la réduction de nitroaryles de façon rapide et douce. Ainsi, Srinivasa *et al.*, ont décrit une méthodologie de couplage réductif de nitroarènes par du magnésium et du triméthylammonium formate dans le méthanol à température ambiante (**Schéma VII-24**).⁴²⁵

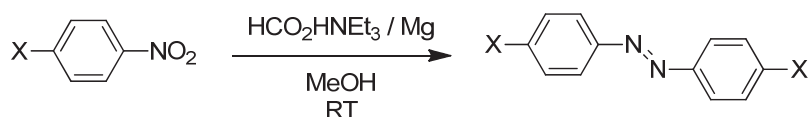


Schéma VII-24 : Formation d'azobenzène par réduction au magnésium de nitroaryles

Ces conditions de synthèse donnent accès à des azobenzènes symétriques avec des rendements d'environ 90%. Par contre, la synthèse de composés asymétriques conduit à la formation d'un mélange qui ne permet pas l'accès à plus de 30 % de produits purs.

D'autres approches pour la formation de liaisons azo ont été développées. Notamment le couplage consécutif d'une hydrazine avec deux halogénoarènes est suivi d'une étape d'oxydation. Ainsi, le carbazate de *tert*-butyle (Boc-NHNH₂) est couplé avec l'halogénoaryle sur l'azote protégé par une catalyse au cuivre ou au palladium en présence d'un ligand.^{426, 427} Une deuxième molécule d'halogénoaryle est à nouveau couplée par catalyse au palladium. A ce stade, Lim *et al.* ont montré qu'il est possible d'oxyder directement, sans déprotection préalable, par l'action de la N-bromosuccinide couplée à du palladium (**Schéma VII-25**).⁴²⁸ Par cette voie de synthèse les auteurs obtiennent des rendements variables, en fonction des substituants portés par les halogénoarènes, allant de 30 à 80 %.

Différentes méthodologies, permettant l'accès à des composés azo aromatiques, ont été décrites, mais il est possible de noter qu'elles ont certaines limites comme leur coût imputable aux types de métaux utilisés,

421. Moore, R. E., *et al. J. Org. Chem.* **1958**, 23, 1504-1506.
422. Hutchins, R. O., *et al. J. Org. Chem.* **1971**, 36, 803-806.
423. Gowda, S., *et al. Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1329-1331.
424. Gowda, S., *et al. Tetrahedron.* **2002**, 58, 2211-2213.
425. Srinivasa, G. R., *et al. Aust. J. Chem.* **2004**, 57, 609-610.
426. Wang, Z., *et al. Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3543-3546.
427. Kwong, F. Y., *et al. Org. Lett.* **2002**, 4, 581-584.
428. Lim, Y. K., *et al. Org. Lett.* **2003**, 5, 979-982.

et une étape obligatoire de purification. De plus, ces méthodes sont décrites sur des composés aromatiques faiblement substitués limitant ainsi le choix des composés pouvant être couplés.

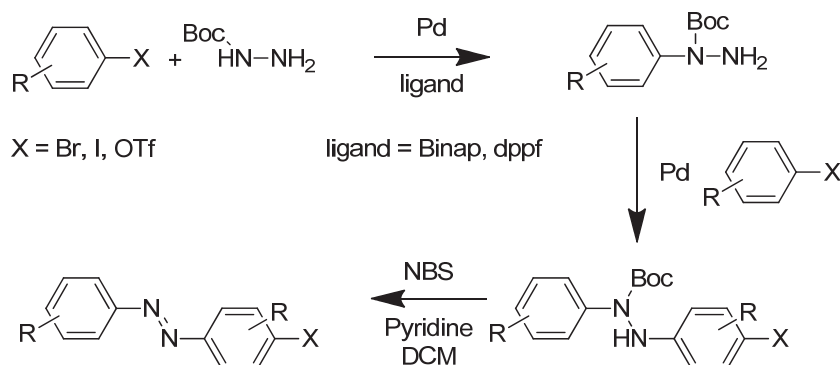


Schéma VII-25 : Formation de liaison azo par arylation de carbazate de *tert*-butyle et oxydation palladocatalysée

Une autre méthodologie de formation de liaisons azo a été largement décrite car elle est utilisée pour la synthèse de colorants azoïques.⁴²⁹ Dans un premier temps, il y a formation *in situ* d'un composé électrophile nommé diazonium. Cette molécule est ensuite directement engagée dans une réaction de SE_{Ar} avec un cycle possédant un groupement donneur d'électrons tel qu'un phénol ou une arylamine (**Schéma VII-26**).^{430,}

431

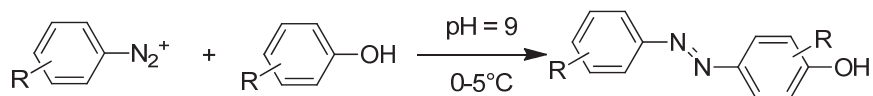


Schéma VII-26 : Formation de liaison azo par copulation azoïque

Cette voie de synthèse a pour principal avantage de se réaliser en solution aqueuse. En fonction des substituants portés par le cycle aromatique nucléophile, différentes orientations de copulations peuvent être réalisées. De plus, cette méthodologie de synthèse est décrite comme robuste et se réalise avec différents motifs aromatiques.

Au regard de ces informations, il nous a semblé intéressant d'utiliser cette méthodologie pour le développement de colorants azoïques.

Pour se faire, une réaction de diazotation préalable est nécessaire.

429. Zollinger, H. *Color Chemistry*. **2004**.

430. Zollinger, H. *Diazo Chemistry I*, **2004**, pp 346-383.

431. Garcia-Amoros, J., et al. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4022-4024.

Les sels de diazonium sont des éléments importants non seulement en synthèse organique classique, mais aussi dans la préparation de nanocomposés organiques.⁴³²⁻⁴³⁷

Malgré une large application en synthèse, ces sels sont des composés instables et de nature explosive puisqu'ils peuvent libérer du N₂. En raison de leur instabilité, les composés diazonium sont rarement isolés. Ils sont alors directement engagés dans une réaction ultérieure. Cette limite d'utilisation a contraint de nombreux chimistes à apporter des modifications à ces sels de diazonium.⁴³⁵

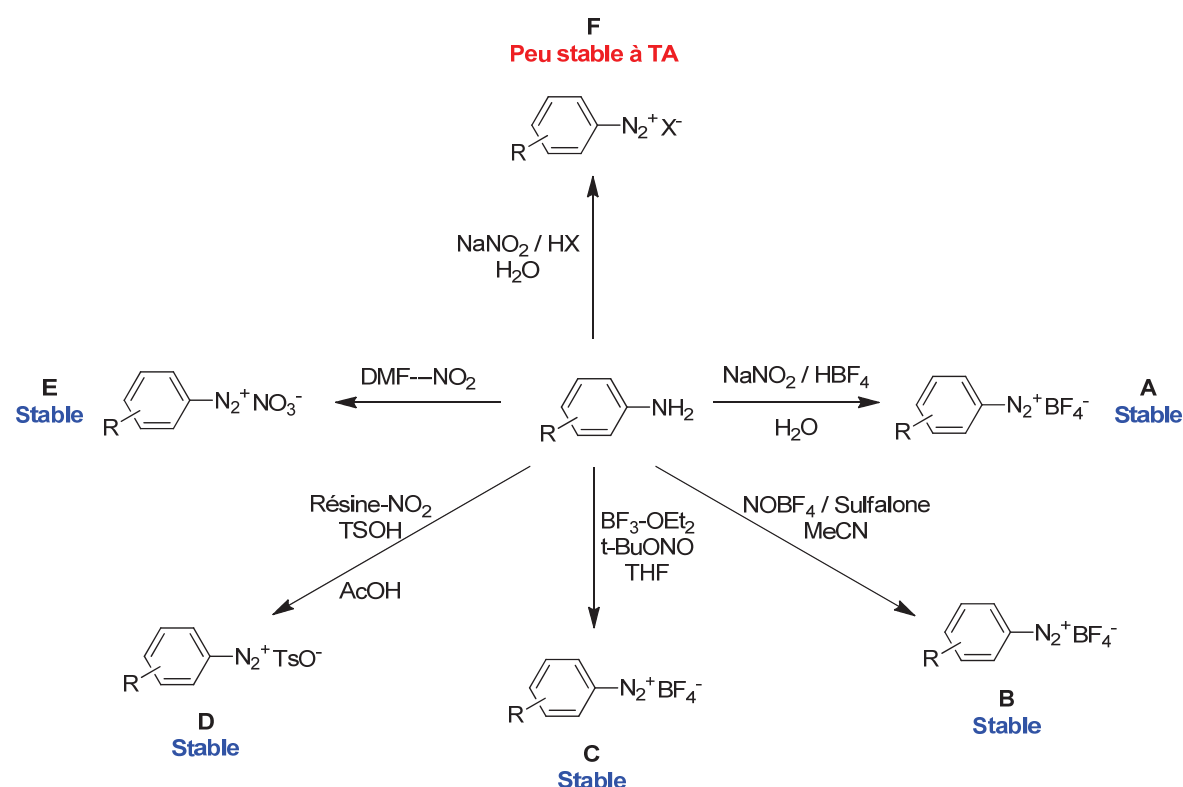


Schéma VII-27 : Principales méthodologies de synthèse d'aryle diazonium

Les sels de tétrafluoroborate stabilisent le diazonium à température ambiante permettant ainsi d'isoler le composé. Différentes méthodologies de synthèse ont été développées pour accéder à ces molécules (Schéma VII-27 A-D). Une des méthodes les plus couramment utilisées est réalisée en présence d'acide tétrafluoroborique et de nitrite de sodium (Schéma VII-27 A).⁴³⁵ Pour des raisons de faible solubilité en solution aqueuse de certains réactifs, des études ont été menées afin de pouvoir réaliser la diazotation en milieu organique. Ainsi, des sels de diazonium peuvent être obtenus dans l'acétonitrile en présence de nitrosonium tétrafluoroborate et de sulfalone avec de bons rendements ou dans le THF avec de l'éthérate de

432. Cygler, M., et al. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 2852-2855.

433. Galli, C. *Chem. Rev.* **1988**, 88, 765-792.

434. Zollinger, H. *The Chemistry of Amino, Nitroso, Nitro and Related Groups*, **2003**, pp 627-663.

435. Roglans, A., et al. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 4622-4643.

436. Yu, S. S. C., et al. *Langmuir*. **2007**, 23, 4662-4668.

437. Tour, J. M. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7477-7496.

trifluorure de bore comme acide de Lewis et de *tert*-butylnitrile (**Schéma VII-27 B-C**).^{438, 439} Ces méthodologies de synthèse conduisent directement à la précipitation du sel de diazonium.

En 2008, Filimonov *et al.*, ont décrit une méthode de diazotation sur résine-NO₂, conduisant à un sel de diazonium stabilisé par un contre ion tosylate (**Schéma VII-27 D**).⁴⁴⁰

Une autre méthode de formation, peu courante, d'aryldiazonium a été décrite par Zhang *et al.*⁴⁴¹ Elle consiste à réaliser la réaction dans la DMF, solvant servant d'absorbant au gaz NO₂, pour former un adduit DMF-NO₂. Cette espèce est un agent oxydant doux qui permet l'obtention de sels de diazonium sous forme solide avec d'excellents rendements (**Schéma VII-27 E**).

La réaction de diazotation classique se réalise en solution aqueuse à froid en présence de nitrite de sodium et d'un acide de Brønsted. Ces sels étant peu stables à température ambiante, ils sont généralement générés *in situ* (**Schéma VII-27 F**).⁴³⁴

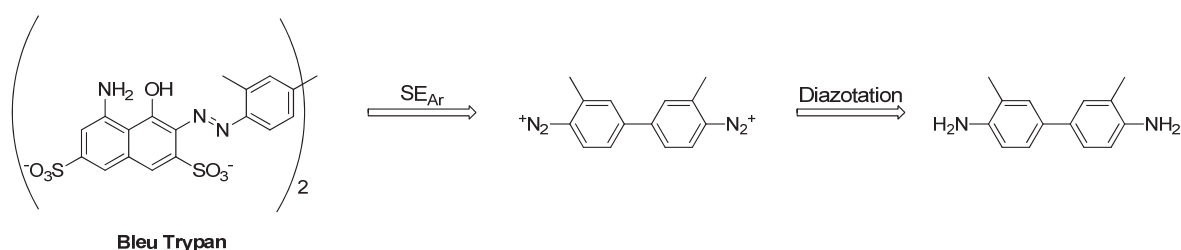


Schéma VII-28 : Schéma rétrosynthétique de synthèse du Bleu Trypan

Les colorants azoïques sont des molécules hydrosolubles, afin de les synthétiser nous avons choisi de réaliser une étape de diazotation par le nitrite de sodium en milieu acide. Ce sel est ensuite engagé *in situ* dans une réaction de copulation azoïque en présence d'un motif naphthalènesulfonique (**Schéma VII-28**).

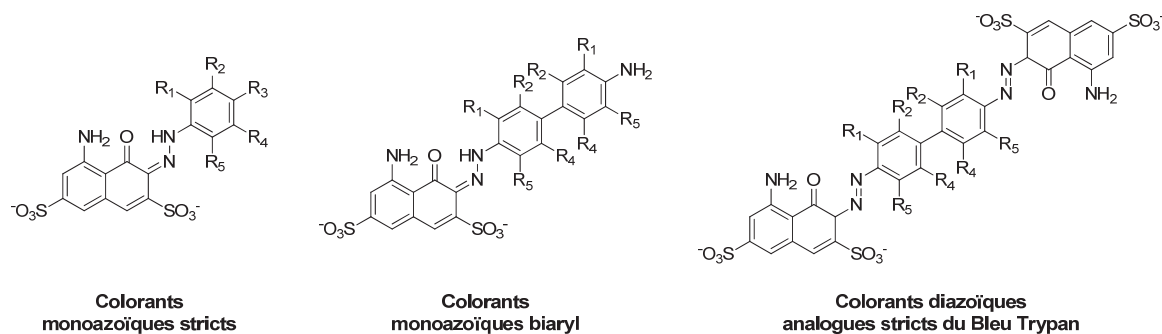


Figure VII-8 : Trois familles d'analogues du Bleu Trypan

Au cours de cette étude, nous nous sommes proposés d'évaluer les paramètres des deux étapes conduisant à l'obtention de colorants azoïques (**Figure VII-8**). La maîtrise de ces étapes a pour objectif le

438. Kosynkin, D. V., *et al. Org. Lett.* **2001**, 3, 993-995.

439. Doyle, M. P., *et al. J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1572-1574.

440. Filimonov, V. D., *et al. Org. Lett.* **2008**, 10, 3961-3964.

441. Zhang, Q. Z., *et al. Synthetic Commun.* **2001**, 31, 1243-1247.

développement de trois familles de colorants permettant d'étudier l'influence de pharmacomodulation sur leur capacité à moduler la recapture du glutamate par les VGLUTs.

VII.2.b Synthèse d'anilines et de benzidines fonctionnalisées

VII.2.b.i Introduction

L'accès aux trois familles de colorants dérivés du Bleu Trypan, précédemment décrites, a nécessité le développement d'anilines et de benzidines fonctionnalisées. Un grand nombre de ces molécules sont disponibles. Cependant, l'accès à certaines d'entre elles a nécessité le développement de voies de synthèse qui sont développées dans ce paragraphe (**Schéma VII-29**).

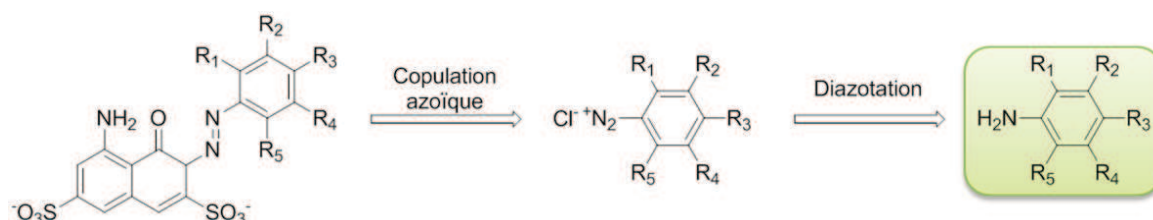


Schéma VII-29 : Schéma rétrosynthétique d'accès aux colorants azoïques

VII.2.b.ii Synthèse de l'acide 4-amino-3,5-diméthylebenzoïque

L'accès à l'acide 4-amino-3,5-diméthylebenzoïque est possible après réduction de l'acide 4-nitro-3,5-diméthylebenzoïque. Deux méthodologies de synthèse par oxydo-réduction en présence d'étain et de zinc ont été sélectionnées, en raison de leurs conditions douces décrites pour ne pas réduire la fonction acide carboxylique, et évaluées.^{442, 443}

En s'inspirant du travail de Suryadevara et *al.*, il a été choisi dans un premier temps de réduire la fonction nitro par l'action du chlorure d'étain.⁴⁴²

Ces conditions n'ayant pas donné de rendement satisfaisant (33 %), la fonction nitro est réduite sous l'action de zinc(0) en milieu acide.⁴⁴³ Cette méthodologie conduit à l'obtention de l'acide 4-amino-3,5-diméthylebenzoïque (**LSP9-1180**) avec un rendement de 79% (**Schéma VII-30**).

442. Suryadevara, P. K., et al. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3703-3715.

443. Pfister, R., et al. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3508-3517.

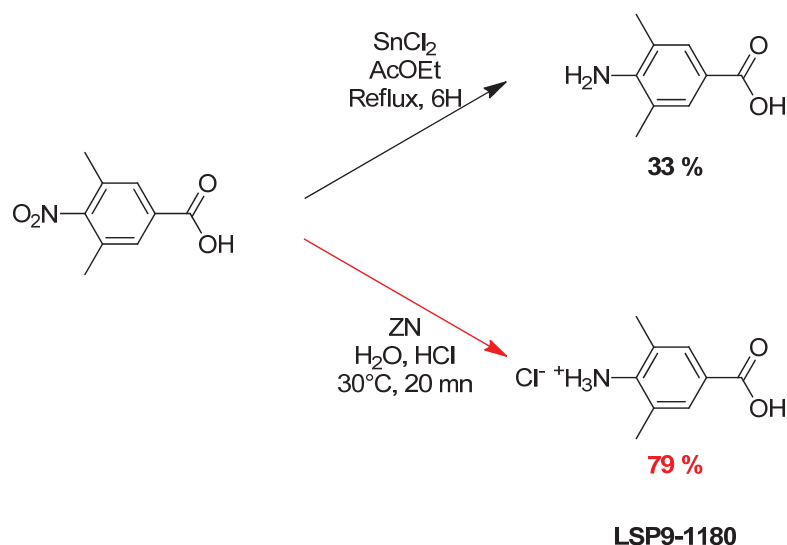
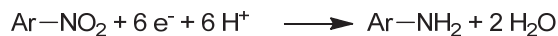
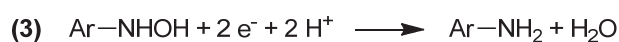
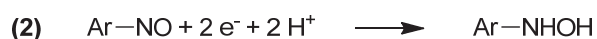
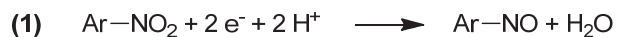


Schéma VII-30 : Synthèse de l'acide 4-amino-3,5-diméthylebenzoïque LSP9-1180

Le mécanisme d'oxydo-réduction à 6 électrons par le $\text{Zn}(0)$ s'est révélé être une méthode de choix. D'un point de vue mécanistique, l'acide 4-nitro-3,5-diméthylebenzoïque subit une première oxydation à deux électrons et deux protons conduisant à l'obtention de l'espèce nitroso correspondante (**Equation VII-1 (1)**). Cette espèce subit une deuxième réduction qui conduit à la N-hydroxyarylamine (**Equation VII-1 (2)**). Sous l'action de deux électrons et de deux protons, il y a formation de l'acide 4-amino-3,5-diméthylebenzoïque (**Equation VII-1 (3)**).



Equation VII-1 : Equation rédox de la réduction de nitro-aryle

Cette méthodologie de synthèse permet un accès aisé et rapide à l'obtention de différentes anilines à partir d'acides nitro-benzoïques ou d'un nitro-phényles.

VII.2.b.iii Accès aux benzamides fonctionnalisés

Comme il l'a été précédemment décrit l'intérêt de ce travail réside dans l'accès à des molécules affines des VGLUTs pouvant être radiomarquées. Un des moyens est de fonctionnaliser des anilines avec des dérivés hydroxyles libres. L'accès à ces dérivés pourra permettre d'être facilement alkylé en dernière étape de synthèse, comme par exemple par de l'iodométhane radiomarké au tritium (I-CT₃).

Ainsi, la synthèse des deux séries de molécules, l'une possédant une fonction hydroxyle libre et l'autre possédant une fonction méthoxy, est nécessaire afin de pouvoir mesurer l'activité inhibitrice des futurs composés marqués sur les VGLUTs (**Schéma VII-31**).

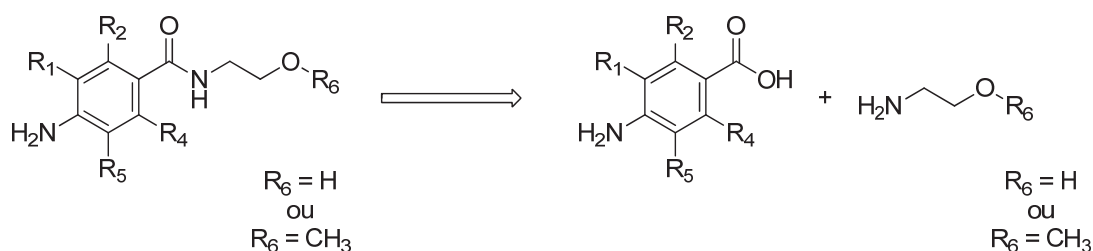


Schéma VII-31 : Schéma rétrosynthétique d'accès aux benzamides fonctionnalisés

L'accès aux dérivés de benzamides fonctionnalisés a nécessité le développement d'une méthodologie de synthèse. En effet, même si dans la littérature la formation de liaison amide est richement décrite, peu d'informations ont pu être répertoriées sur des motifs similaires.

Le but de la méthodologie développée est de concevoir une synthèse robuste et extrapolable à d'autres acides aminobenzoïques.

Afin d'éviter une synthèse multi étapes et sachant qu'une amine primaire est plus réactive qu'une aniline, il a été envisagé de ne pas protéger la fonction amine de l'acide 4-aminobenzoïque tout en prenant le risque de faire polymériser cette aniline. Polymérisation qui a eu lieu à température ambiante.

Ainsi deux méthodologies de formation de liaison amide ont été sélectionnées et évaluées.⁴⁴⁴⁻⁴⁴⁶

En s'inspirant du travail de Laras *et al.*⁴⁴⁵, le choix du solvant s'est porté sur du dichlorométhane distillé avec du PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) comme agent de couplage et une base, la DIEA (**Schéma VII-32**). Cette synthèse conduit à l'obtention du composé **LSP9-2016** avec un rendement de 35 % après 16h de réaction.

Dans le but d'augmenter le rendement, il a donc été préféré d'utiliser des agents de couplages connus pour leur robustesse et leurs efficacité. De ce fait, le couplage avec de l'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimidehydrochloride), de l'hydroxybenzotriazole (HOBt) en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) a été privilégié.^{444, 446} La réaction est réalisée dans de la DMF en présence de triéthylamine comme base (**Schéma VII-32**). Le composé désiré est obtenu avec un rendement de 92 %.

444. Han, S.-Y., *et al. Tetrahedron*. **2004**, 60, 2447-2467.

445. Laras, Y., *et al. Org. Biomol. Chem*. **2005**, 3, 612-8.

446. Joullie, M. M., *et al. Arkivoc*. **2010**, 189-250.

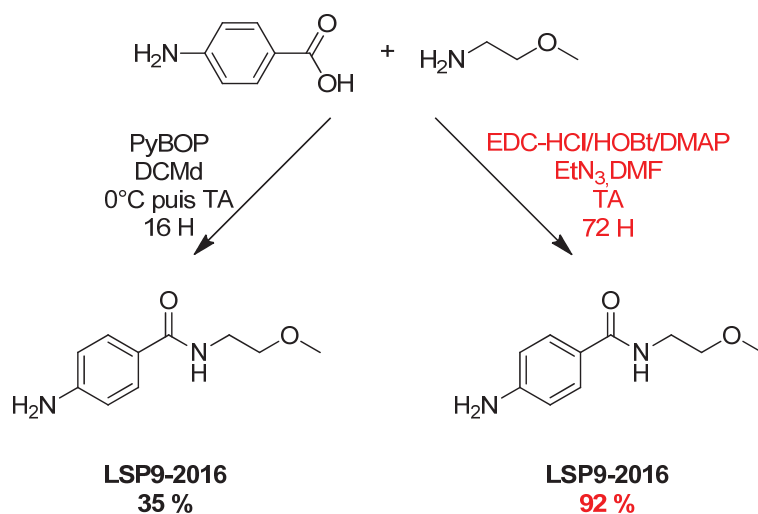
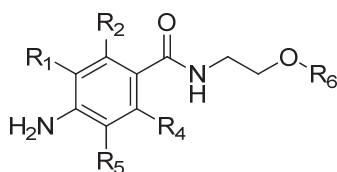


Schéma VII-32 : Synthèse du composé LSP9-2016

L'utilisation de la DMF a permis, entre autre, de simplifier les purifications de ces composés. En effet, en fin de réaction les agents de couplages précipitent dans la DMF. Le filtrat est alors collecté puis évaporé, les éventuelles traces de réactifs, de triéthylamine sont enlevées par simple filtration sur silice.

Au regard de l'excellent rendement obtenu et d'une méthode de purification simplifiée, ces conditions opératoires ont été sélectionnées et appliquées à différents dérivés de l'acide 4-aminobenzoïque en présence de méthoxyéthanolamine et d'éthanolamine. Les résultats de ces réactions sont résumés dans le **Tableau VII-8**.

Tableau VII-8 : Résultats des couplages de formation des dérivés de benzamides



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | Rendements |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------|
| LSP9-2048 | OMe | H | H | H | H | 68 % |
| LSP9-2059 | OMe | H | H | H | CH ₃ | 52 % |
| LSP9-2077 | CH ₃ | H | H | CH ₃ | H | 76 % |
| LSP9-2078 | CH ₃ | H | H | CH ₃ | CH ₃ | 40 % |
| LSP9-2055 | CH ₃ | H | H | H | H | 100 % |
| LSP9-2052 | CH ₃ | H | H | H | CH ₃ | 91 % |
| LSP9-2060 | H | H | H | H | H | 99 % |
| LSP9-2016 | H | H | H | H | CH ₃ | 92 % |
| LSP9-2038 | Cl | H | H | H | H | 95 % |
| LSP9-2039 | Cl | H | H | H | CH ₃ | 87 % |
| LSP9-2031 | F | H | H | H | H | 92 % |
| LSP9-2034 | F | H | H | H | CH ₃ | 92 % |
| LSP9-2069 | CF ₃ | H | H | H | H | 80 % |
| LSP9-2070 | CF ₃ | H | H | H | CH ₃ | 84 % |
| LSP9-2033 | F | F | F | F | H | 97 % |
| LSP9-2037 | F | F | F | F | CH ₃ | 93 % |

Le mécanisme de formation de ces molécules est composé de quatre étapes. L'EDC réagit avec l'acide carboxylique du réactif afin de former un ester activé nommé O-acylisourée. Parallèlement, sous l'action de la triéthylamine l'HOBt est déprotonné. Ainsi, l'oxygène nucléophile attaque l'ester activé pour libérer le sous-produit de l'EDC et former l'ester d'hydroxybenzotriazol. C'est cet ester activé qui va réagir avec l'amine primaire de l'éthanolamine ou de la méthoxyéthanolamine et libérer l'HOBt. Ce dernier, dont le pKa est de 4,6, arrache un proton de l'amidium pour conduire à la fonction amide (**Schéma VII-33**).^{446, 447}

Ainsi, 16 dérivés de benzamides ont été synthétisés avec des rendements compris entre 40 % et 100 %. Les rendements moins élevés des composés substitués en *ortho* de l'aniline par des groupements mésomères donneurs (**LSP9-2048** et **LSP9-2059**) ou par des groupements inductifs donneurs (**LSP9-2048** et **LSP9-2077**) peuvent s'expliquer par les effets électroniques induits par ces fonctions. Ces effets renforcent alors la nucléophilie du doublet libre de l'azote, de ce fait il peut y avoir formation de polymères de

447. Fathalla, M. F., et al. *J. Chem. Soc. Pakistan*. **2011**, 33, 324-332.

réactifs. La polymérisation aurait alors lieu par compétition entre l'aniline et l'amine primaire sur l'ester d'1-hydroxybenzotriazol.

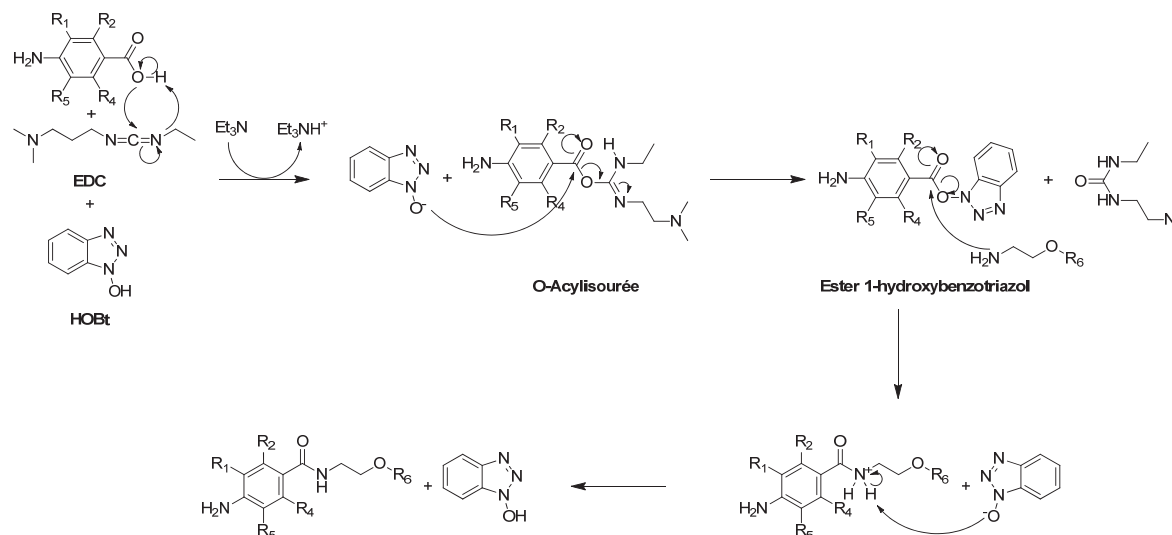


Schéma VII-33 : Mécanisme de formation de liaison amide par HOBt/EDC

Cette méthodologie de synthèse de formation de liaison amide sur des acides aminobenzoïques permet l'accès à des dérivés de benzamides avec de très bons rendements, de façon reproductible et avec une étape de purification simplifiée.

VII.2.b.iv Synthèse d'analogues de benzidine

➤ Synthèse de la 3,3'-difluorobiphényle-4,4'-diamine

Afin de pouvoir développer des analogues simplifiés du Bleu Trypan, il a fallu développer différents dérivés de benzidine pour réaliser des pharmacomodulations sur le site 1 (**Figure VII-9**). Dans cette optique, la synthèse du 3,3'-difluorobiphényle-4,4'-diamine a été réalisée en s'appuyant sur le travail d'Ikeda *et al.*⁴⁴⁸,

449

448. Bamfield, P., *et al. Synthesis*. **1978**, 537-538.

449. Ikeda, T., *et al. Org. Lett.* **2007**, 9, 1481-1484.

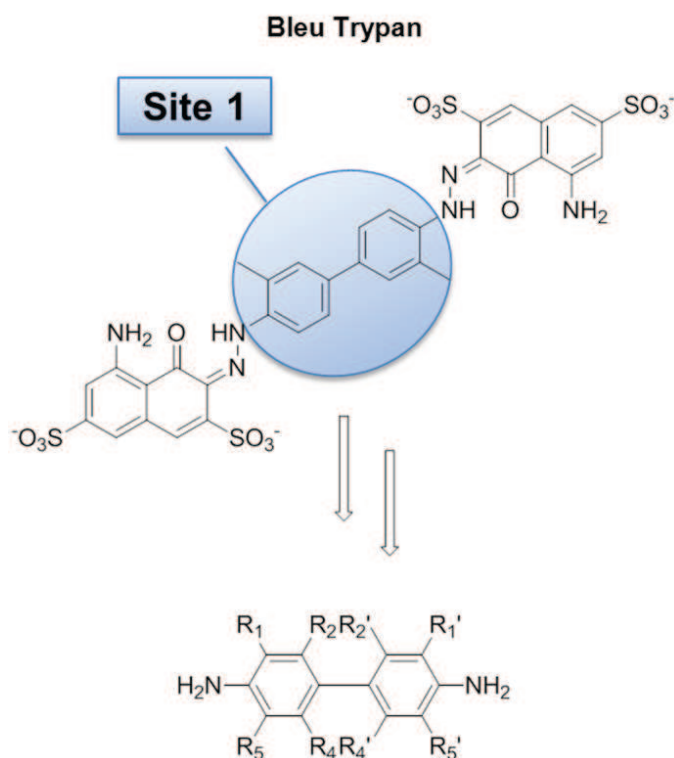


Figure VII-9 : Synthèse d'analogue de benzidine pour pharmacomodulation du site 1

La 4-bromo-2-fluoroaniline est traitée par de la soude et du formiate de sodium en présence de palladium sur charbon et d'un surfactant le CTAB (Bromure de cetyl triméthylammonium).

Par ce biais, trois composés ont pu être séparés et caractérisés. (**Schéma VII-34**)

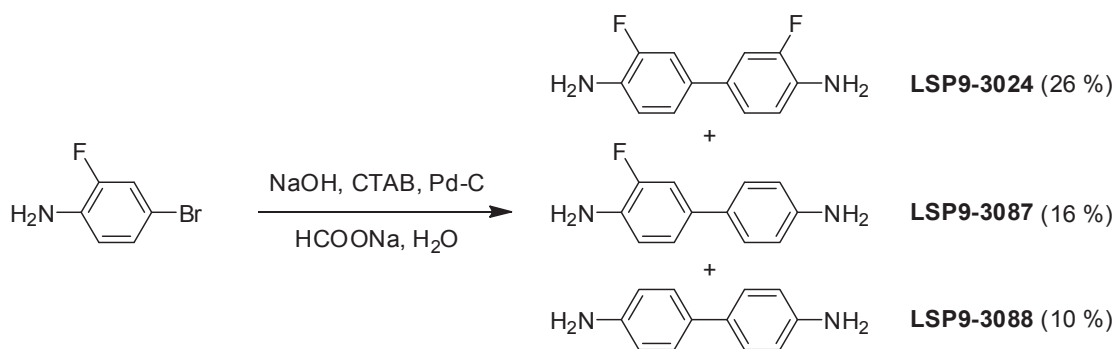
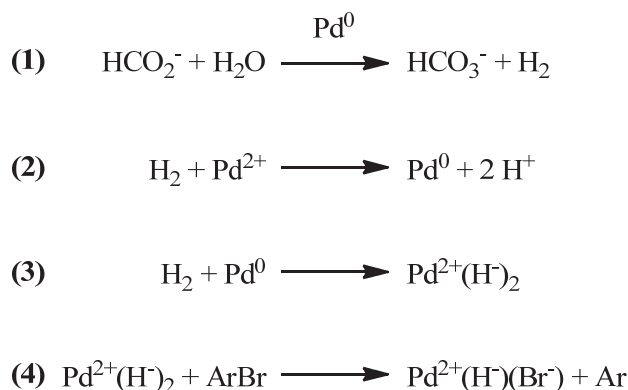


Schéma VII-34 : Synthèse des composés LSP9-3024, LSP9-3088 et LSP9-3089

Il s'est avéré que le premier produit obtenu est le 3,3'-difluorobiphényle-4,4'-diamine (**LSP9-3024**). Ce produit se présente sous la forme d'une poudre orangée obtenu avec un rendement de 26 %. Le deuxième produit élué est la 3-fluorobenzidine (**LSP9-3087**), obtenu avec un rendement de 16%. Enfin, le dernier produit isolé est la benzidine (**LSP9-3088**) sous forme d'une poudre brune obtenu avec 10% de rendement.

Un mécanisme de cette réaction pallado-catalysée de formation de biaryles en présence de soude, de formate de sodium et d'un agent tensio-actif a été proposé par Mukhopadhyay *et al.*⁴⁵⁰

Dans un premier temps, le formate réagit avec l'eau pour former du bicarbonate et du dihydrogène catalysé par le palladium (**Equation VII-2 (1)**) Le dihydrogène formé peut alors réduire le palladium(II) en palladium(0). (**Equation VII-2 (2)**) Le dihydrogène dissocie alors le palladium de la surface (**Equation VII-2 (3)**). Lors de cette méthodologie de synthèse le formate est ajouté par portion afin d'augmenter la réduction du palladium(II) en palladium(0) et ainsi conduire à la réduction de la bromoaniline en aniline (**Equation VII-2 (4)**).



Equation VII-2

Le cycle catalytique est amorcé par la coordination de la bromoaniline au palladium, puis par transfert électronique il y a formation d'un anion radicalaire stabilisé par la coordination au Pd^+ .

A cause de l'instabilité du système, après deux tours de cycles, la Pd^+ se dismute en Pd^0 et Pd^{2+} . Ainsi, les deux bromoanilines voient leurs liaisons $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Br}$ rompues et conduire à la formation de deux radicaux anilines. Ces radicaux, de par la présence du cluster de palladium, se couplent pour former le motif benzidine (**Schéma VII-35**).

La liaison C-F est la simple liaison la plus forte que peut former un carbone. Pourtant lors de cette synthèse, des liaisons carbone-fluor ont été rompues. Au regard du mécanisme décrit précédemment, les conditions utilisées permettent la rupture de liaisons $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Br}$, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-Cl}$. Ainsi, il est envisageable qu'elles conduisent de façon identique à la rupture de liaisons $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-F}$ par l'action du palladium. De plus, Cellier *et al.* ont étudié l'hydrodéphalogenation de différents composés aromatiques en présence de palladium sur charbon et ont montré qu'à température ambiante cette perte d'halogène se réalise aisément.⁴⁵¹

450. Mukhopadhyay, S., *et al.* *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1999**, 2481-2484.

451. Cellier, P. P., *et al.* *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7191-7195.

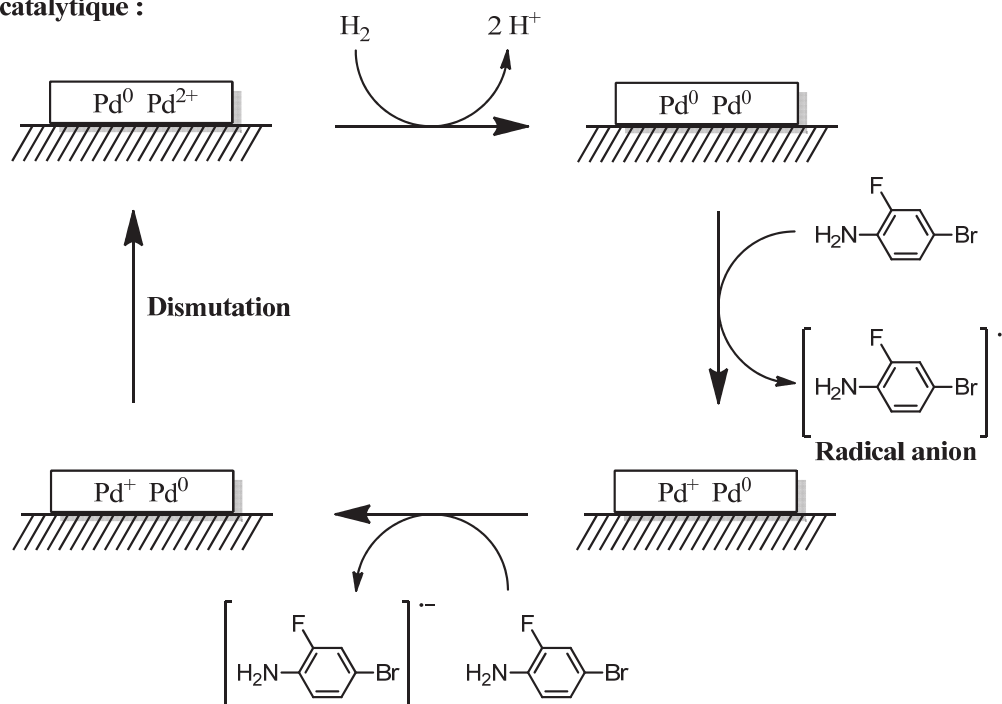
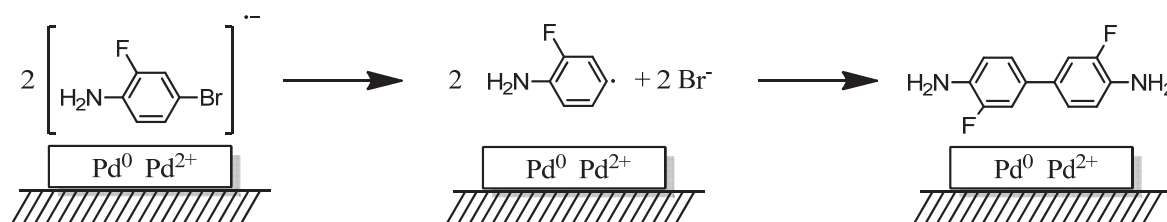
Cycle catalytique :**Couplage radicalaire :**

Schéma VII-35 : Mécanisme proposé de couplage biaryle palladocatalysé d'après Mukhopadhyay et al.⁴⁵⁰

La méthodologie de synthèse précédemment décrite, outre l'obtention de benzidines symétriques, permet l'accès à des dérivés asymétriques de benzidine avec un seul atome d'halogène.

➤ Synthèse d'analogues de benzidine par réaction de Suzuki-Miyaura

La synthèse de la 3,3'-difluorobiphényle-4,4'-diamine et de ses sous-produits de réaction a ouvert la voie au développement de benzidine asymétrique. Afin d'accéder à de nouveaux motifs benzidine, un travail de formation de liaison $\text{C}_{\text{Ar}}-\text{C}_{\text{Ar}}$ par couplage de Suzuki-Miyaura a été initié.

Ces synthèses ont donc été envisagées via un couplage de Suzuki-Miyaura classique. Ceci implique de synthétiser lors d'une première étape l'acide boronique de la molécule désirée puis dans un second temps de créer la liaison carbone-carbone entre cet acide boronique et l'halogénoaniline (**Schéma VII-36**).

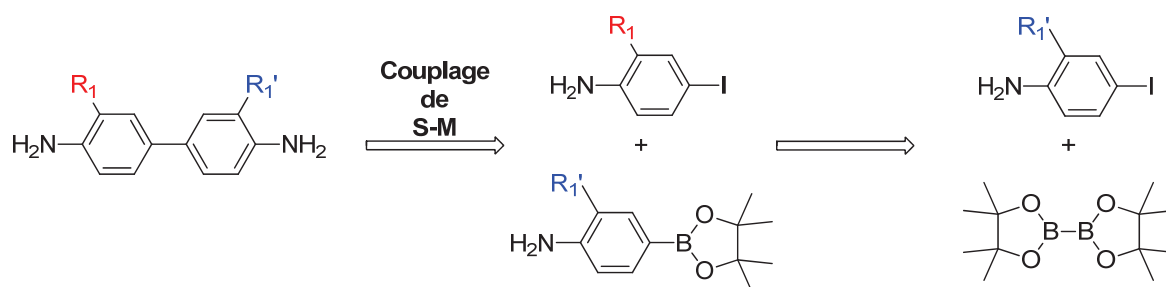
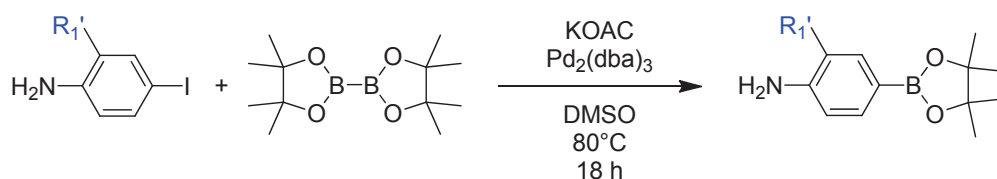


Schéma VII-36 : Schéma rétrosynthétique de développement de benzidines

Différentes réactions ont été mises en œuvre afin de préjuger de l'effet des substituants portés par une aniline.

Une réaction classique de formation de l'acide boronique a été réalisée, à savoir l'utilisation d'une base, l'acétate de potassium et d'un catalyseur au palladium ($\text{Pd}_2(\text{dba})_3$) dans le diméthyle sulfoxyde. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le **Tableau VII-9**.

Tableau VII-9 : Résultats de formation d'acides boroniques d'anilines



| Référence | R_1' | Rendements |
|-----------|--------|------------|
| LSP9-1056 | Me | 10 % |
| LSP9-1060 | H | 48 % |
| LSP9-1078 | F | 53 % |

Il a été montré dans la littérature qu'une des meilleures bases permettant la réaction de formation de l'aniline-bis(pinacolato)diborane est l'acétate de potassium.^{452, 453} La base étant un élément important de cette réaction puisqu'elle va coordonner le palladium et permettre le départ d'un anion halogénure.

Lors de cette étude, la nature des substituants s'est révélée être un facteur limitant. En effet, il apparaît qu'un groupement électroattracteur en *ortho* de l'aniline tend à augmenter le rendement de la réaction alors qu'un groupement électro-donneur va le diminuer.⁴⁵³ Ces rendements ont été comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions expérimentales avec la 4-iodoaniline. L'effet des groupements électroattracteurs s'expliquerait par la fragilité induite sur la liaison carbone-iode. C'est cette liaison qui va être rompue lorsque le palladium, initialement sous forme Pd^0 , est introduit par addition oxydante entre le groupement aryle et l'iode. De ce fait, la présence de groupements électroattracteurs sur le cycle aromatique va polariser la

452. Murata, M., *et al. J. Org. Chem.* **1999**, 65, 164-168.

453. Zhu, L., *et al. J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3729-3732.

liaison dans le sens souhaité et faciliter l'introduction du palladium dans la liaison. Cependant une protection de l'amine, par exemple une acylation bloquerait l'effet mésomère donneur de l'amine à pH basique.

Les acides boroniques d'anilines synthétisés ont alors été engagés dans des réactions de couplage de Suzuki-Miyaura en condition classique. Cependant, les rendements des réactions étant médiocres, une stratégie de génération d'organoboranes *in situ* a été réalisée. Cette méthodologie de synthèse est d'ailleurs décrite comme étant une voie optimale pour l'obtention d'arylboronates.⁴⁵⁴

De ce fait, une méthodologie de synthèse de benzidines en *one-pot* a été optimisée. L'organoborane est généré *in situ* en présence de palladium(II) acétate et d'acétate de potassium. La formation de la liaison C_{Ar}-C_{Ar} est réalisée avec du carbonate de césium et du tétrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (**Schéma VII-37**).

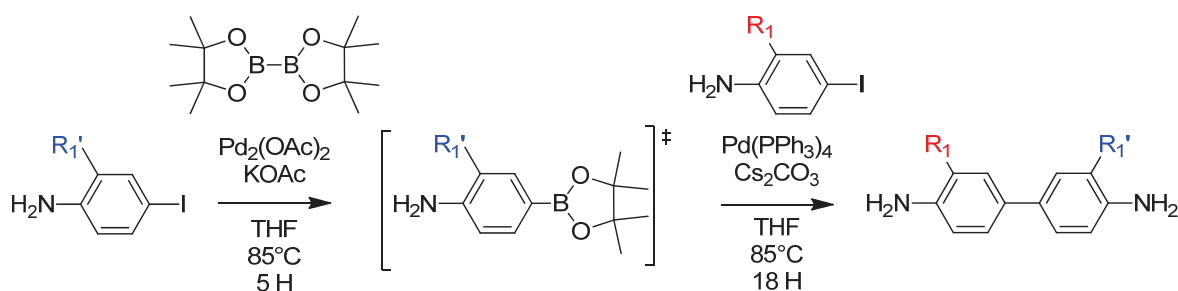
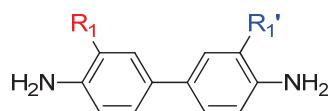


Schéma VII-37 : Synthèse par couplage de Suzuki-Miyaura *one-pot*

Les résultats obtenus sont résumés dans le **Tableau VII-10**.

Tableau VII-10 : Résultats de couplage de Suzuki-Miyaura *one-pot*



| Référence | R ₁ | R ₁ ' | Rendements |
|-----------|------------------|------------------|------------|
| LSP9-1106 | OCF ₃ | Me | 4 % |
| LSP9-1058 | Me | H | 8 % |
| LSP9-1088 | Me | F | 25 % |
| LSP9-1084 | F | H | 49 % |
| LSP9-1086 | F | F | 80 % |

L'optimisation de cette méthodologie de synthèse a permis de révéler l'importance du solvant, de la base et du catalyseur au palladium.

454. Maddaford, S. P., *et al.* Ibid. **1994**, 59, 6501-6503.

Ainsi, le tétrahydrofurane (THF) s'est révélé être un solvant de choix que ce soit pour la formation de l'arylboronate *in situ* ou pour la réaction de Suzuki-Miyaura elle-même. Ceci s'explique notamment par son caractère aprotique polaire et chélatant.

L'acétate de potassium a été sélectionné pour la formation de l'arylboronate en raison de sa faible basicité. Ce facteur s'est révélé avoir une influence sur l'étape de transmétallation (**Schéma VII-38**).

Le palladium acétate est pourtant capable à lui seul de catalyser la formation du boronate et le couplage aryle, cependant cette dernière étape est accélérée par l'ajout de palladium(II).

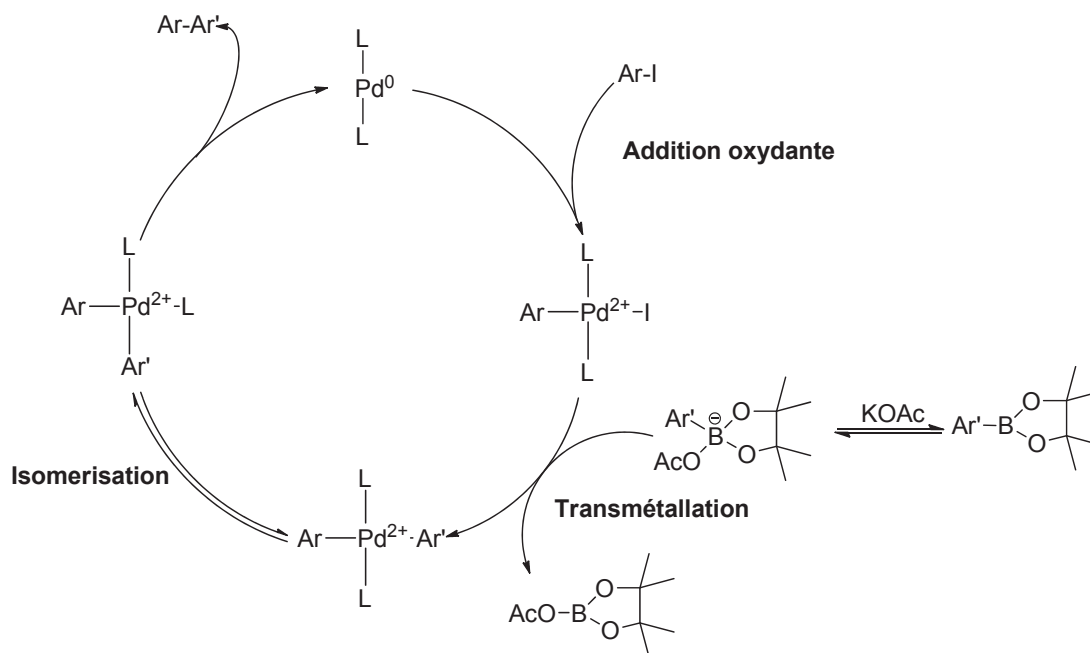


Schéma VII-38 : Cycle catalytique de la réaction de Suzuki-Miyaura d'après Miyaura *et al.*^{455, 456} et Li *et al.*⁴⁵⁷

Au regard des résultats, il est possible de faire les mêmes constations que celles établies précédemment lors de la formation des acides boroniques. A savoir, que plus les anilines portent des groupements inductifs donneurs en *ortho* de l'aniline, meilleurs sont les rendements. Ainsi, le composé **LSP9-1086** possédant en R₁ et R₁' deux atomes de fluor a un rendement de 80 % alors que le composé **LSP9-1086** possédant en R₁ un fluor et R₁' un hydrogène voit son rendement chuté à 49 %.

Il a alors été postulé que l'étape limitante est celle de transmétallation. Ainsi, à cause des effets inductifs donneurs des substituants des anilines, la rupture de la liaison entre le carbone et le bore de l'organoborane serait plus difficile.

Pour vérifier cette hypothèse, il a été choisi de comparer les rendements d'obtention du composé **LSP9-1088** réalisé soit en générant l'organoborane à partir 2-fluoro-4-iodoaniline soit à partir 2-méthyle-4-

455. Miyaura, N., *et al. Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440.

456. Miyaura, N., *et al. J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866-867.

457. Li, J. H., *et al. J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2832-2834.

iodoaniline. Ainsi, lorsque l'organoborane est réalisé en présence de l'amine possédant un effet inductif donneur le composé **LSP9-1088** est obtenu avec un rendement de 14 %, alors qu'il est de 25 % dans le cas de l'amine portant un atome de fluor qui a un effet inductif attracteur.

Ces données confortent l'hypothèse que les anilines ayant des substituants inductifs donneurs, et de surcroît dont les pKa des anilines augmentent, établissent une liaison plus difficile à rompre pour que la coordination du catalyseur se fasse. Un facteur important, à prendre en compte, est la solubilité des anilines. Il a pu être remarqué que les anilines portant des substituants inductifs attracteurs, tel que le fluor, possèdent une bonne solubilité en solvant organique contrairement à leurs homologues substitués par groupements inductifs donneurs.

Ces premières études de synthèse de plusieurs benzidines ont montré qu'il est possible de synthétiser des molécules asymétriques et ce avec des rendements convenables. Cependant, une optimisation des paramètres de synthèse devrait être réalisée pour le développement d'un plus grand nombre de ces dérivés.

VII.2.b.v Conclusions

Afin de pouvoir développer différents analogues du Bleu Trypan, un certain nombre d'anilines, de benzamides et de benzidines ont été développés. La réduction de nitro-phénols en conditions douces laisse envisager l'accès à un plus grand nombre d'anilines fonctionnalisées.

Une série de seize benzamides fonctionnalisés a été synthétisée avec de très bons rendements et une étape de purification facilitée.

De la même manière, différents dérivés symétriques et asymétriques de benzidine ont été réalisés et ce exclusivement de façon palladocatalysée.

Ce travail d'accès à des amines aromatiques a permis d'augmenter la librairie de molécules disponibles pour être engagées dans une réaction de diazotation.

VII.2.c Réaction de diazotation

VII.2.c.i Introduction

La diazotation est la deuxième étape d'accès aux colorants azoïques de type Bleu Trypan (**Schéma VII-39**). Nous nous sommes proposés d'évaluer les différents paramètres de cette réaction sur des anilines et des benzidines fonctionnalisées.

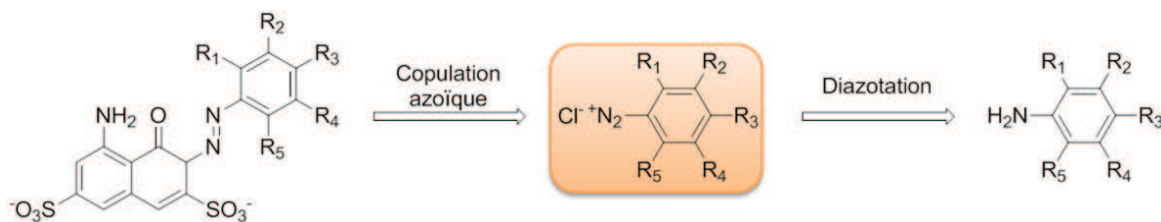
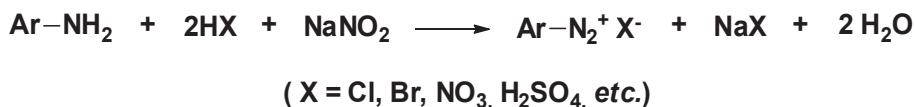


Schéma VII-39 : Synthèse de colorants azoïques : étape de diazotation

➤ Généralités sur la réaction de diazotation

La première étape d'accès aux colorants azoïques mise en jeux est une réaction de diazotation d'anilines.

Cette réaction est généralement réalisée en solution aqueuse à froid. La conversion en diazonium est réalisée par ajout de nitrite de sodium (NaNO_2) et d'un acide de Brønsted comme l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique (**Equation VII-3**).



Equation VII-3 : Diazotation d'aniline

Il est possible d'identifier trois étapes majeures :

- la première étape est la formation de l'espèce réactive NO^+ provenant de la déshydratation de l'acide nitreux,
- le nucléophile va ensuite réagir sur l'oxyde nitrique pour conduire à la formation de l'espèce diazo hydroxyde,
- la déshydratation de cette espèce conduit à la formation du diazonium.

En théorie, l'utilisation d'au moins deux équivalents d'acide est nécessaire pour réaliser la réaction. Pourtant, en pratique plus de deux équivalents d'acide sont utilisés à cause des différents équilibres acide-base impliqués.⁴²⁹ Cependant, l'excès d'acide nitreux (HONO) est à proscrire. Cet excès a tendance à déstabiliser les ions diazonium et conduit à la formation de produits secondaires tels que des nitro-aryles ou

des réactions de polymérisation résultant d'un couplage entre le diazonium et l'amine primaire du réactif qui conduit à un colorant azoïque dérivé d'azobenzène.⁴⁵⁸ Fitzpatrick *et al.* ont d'ailleurs pu comparer les réactivités de différents sous-produits d'acides nitreux.⁴⁵⁸

D'un point de vue mécanistique, la diazotation d'amine aromatique a été élucidée par Hughes, Ingold et Ridd en 1958 puis réexaminée par Ridd et Williams.⁴⁵⁹⁻⁴⁶²

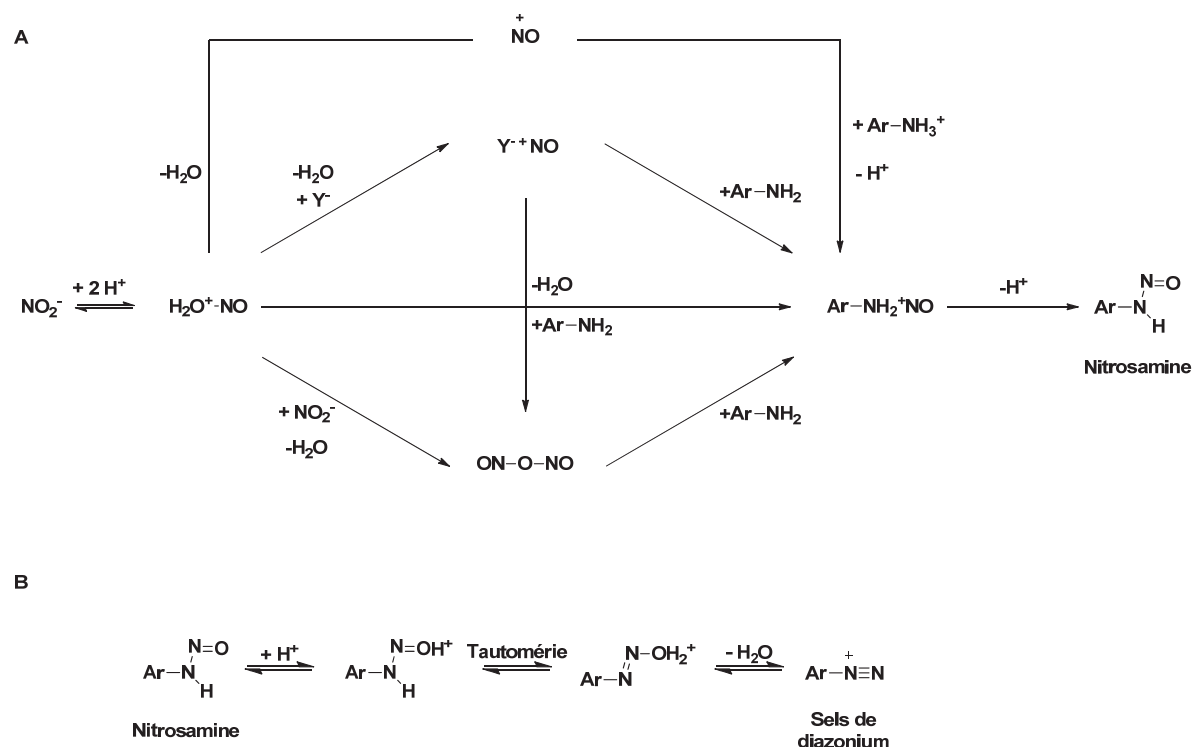


Schéma VII-40 : Mécanisme de formation de nitrosamine (A) et du diazonium (B) d'après Hughes, Ridd et Williams⁴⁵⁹⁻⁴⁶²

La formation du réactif de diazotation est réalisée par la protonation de l'acide nitreux ($\text{H}_2\text{O}^+-\text{NO}$)

L'espèce $\text{H}_2\text{O}^+-\text{NO}$ est d'abord transformée en un sel minéral de l'ion nitrosonium (Y^+-NO , Y correspondant au contre ion de l'acide utilisé) puis il s'en suit la nitrosation de l'amine. En présence de chlorure d'hydrogène (HCl) ou de bromure d'hydrogène (HBr), il y a respectivement formation de l'espèce chlorure de nitrosyle (Cl^+-NO) et bromure de nitrosyle (Br^+-NO). Par contre, en condition acide perchlorique ou acide sulfurique dilué, les ions perchlorates ou hydrogénosulfates ne sont pas assez nucléophiles, ainsi l'espèce $\text{H}_2\text{O}^+-\text{NO}$ réagit à nouveau avec du nitrite pour former du trioxyde de dinitrogène (ON-O-NO). Cette espèce réagit ensuite avec l'amine aromatique pour conduire à l'intermédiaire diazo hydroxyde ou nitrosamine (Ar-NHNO) (**Schéma VII-40 A**).

458. Fitzpatrick, J., *et al. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* **1984**, 927-932.
 459. Hughes, E. D., *et al. J. Chem. Soc.* **1958**, 58-65.
 460. Hughes, E. D., *et al. J. Chem. Soc.* **1958**, 65-69.
 461. Ridd, J. H. *Chem. Soc. Rev.* **1961**, 15, 418-441.
 462. Williams, D. L. H. *Nitrosation.* **1988**.

C'est la faible proportion d'amine, par rapport à l'anilinium, qui va réagir et déplacer l'équilibre pour réaliser la diazotation.

Cependant, dans des conditions plus acides, c'est-à-dire en présence d'acide sulfurique ou perchlorique concentré, Ridd et *al.* ont proposé que l'étape limitante serait celle de nitrosation du composé anilinium conduisant à l'intermédiaire ArNH_2^+NO suivie d'une étape de déprotonation conduisant à l'intermédiaire diazo hydroxyde (**Schéma VII-40 A**).⁴⁶³

La nitrosation de l'amine aromatique est l'étape clé de la diazotation. Dans le cas des amines primaires, la nitrosamine (Ar-NHNO) est un intermédiaire qui est rapidement transformé en son sel de diazonium (**Schéma VII-40 B**).

L'espèce diazo hydroxyde subit ensuite une étape de prototropie qui conduit à l'obtention du sel de diazonium désiré. Le **Schéma VII-41** correspond au mécanisme simplifié de formation de sels de diazonium résumant les schémas précédents (**Schéma VII-40 A** et **Schéma VII-40 B**).

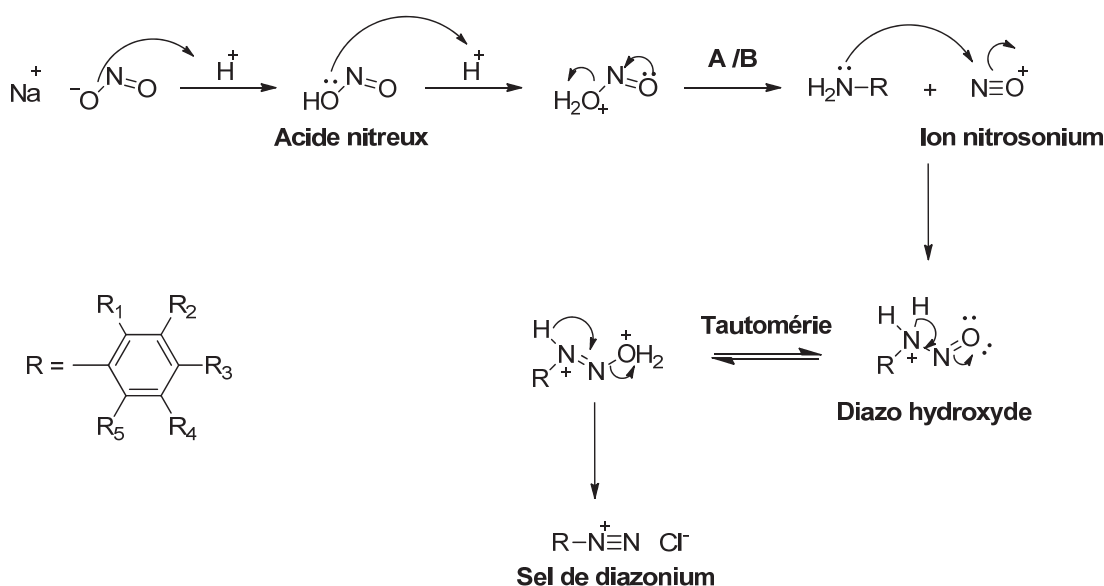


Schéma VII-41 : Mécanisme simplifié de formation de sels de diazonium

➤ Instabilité des sels de diazonium

Les sels de diazonium sont des composés connus pour leur instabilité et le fait qu'ils soient explosifs. En effet, ils peuvent libérer un des meilleurs nucléofuges connus, le N_2 . Cependant, il existe des différences de stabilité en fonction de la nature des composés portant la fonction diazonium et des contre-ions utilisés.

Dans le cas des diazonium primaires, le sel de diazonium est très instable et perd immédiatement de l'azote gazeux pour donner un carbocation plan peu stable. Par contre, dans le cas des aryldiazonium, la fonction diazonium est stabilisée par mésomérie rendant l'espèce plus stable.

463. Ridd, J. H. *J. Soc. Dyers Colour.* **1965**, 355.

Cependant, ces composés sont assez sensibles à la température et à l'action des nucléophiles. Par exemple, à température ambiante et en milieu basique, la liaison $C_{Ar}-N_2^+$ du sel de diazonium se rompt et l'anion hydroxyde nucléophile attaque la lacune vacante du cation aryle conduisant à la formation d'un phénol (**Schéma VII-42**).⁴²⁹

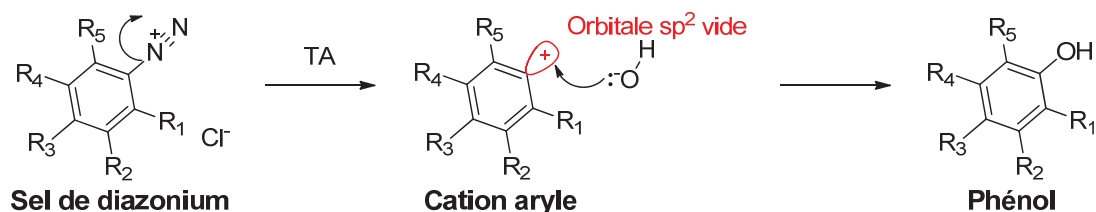
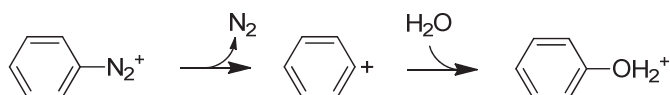
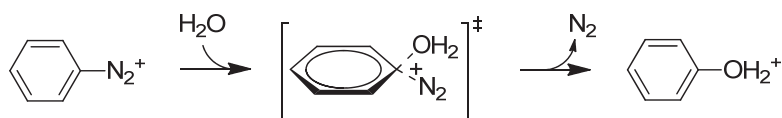


Schéma VII-42 : Dégradation de sel de diazonium à température ambiante en milieu basique

S_N1Ar Bimoléculaire



S_N2Ar Bimoléculaire



S_N2Ar Bimoléculaire avec pré- et post- coordination

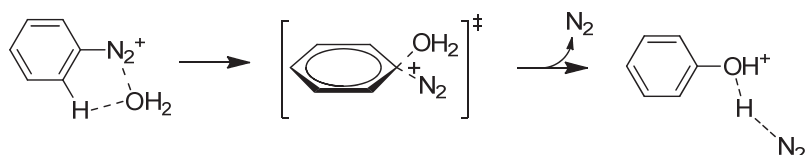


Schéma VII-43 : Réactions de SN_{Ar} proposées de l'eau sur le diazobenzène d'après Wu et al.⁴⁶⁴

Il existe peu d'études sur la transformation de diazonium en phénol. Cependant, Wu et al. ont proposé trois types de mécanisme de substitution nucléophile aromatique (SN_{Ar}) pour expliquer la formation de phénols par action de l'eau sur le diazobenzène (**Schéma VII-43**).⁴⁶⁴ Les auteurs ont montré que la réaction est dominée par un mécanisme bimoléculaire dans le cas de solvants apolaires, alors qu'elle est de type S_N1Ar dans le cas de solvants faiblement polaires.

464. Wu, Z., et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10632-10639.

VII.2.c.ii Evaluation des paramètres de la diazotation d'anilines substituées

Au premier abord, la synthèse de diazonium est une réaction simple qui devrait ne nécessiter qu'une seule précaution : le maintien d'une température basse pendant la réaction. Pourtant, il en est autrement. En fonction de la nature des anilines à diazoter, des variations de conditions opératoires doivent être apportées.

Au regard des résultats décrits dans la littérature, il a été choisi de diazoter les anilines en présence de nitrite de sodium et d'acide chlorhydrique à 0°C.⁴⁶⁵ Cette méthodologie de synthèse étant décrite dans la littérature comme la plus robuste concernant la synthèse de colorants azoïques.

La spectroscopie RMN est une méthode de choix pour l'analyse de la réaction de diazotation notamment en raison de la présence de la fonction diazonium qui a pour effet de déblinder fortement les protons de la molécule conduisant à l'obtention de signaux très caractéristiques.

Ainsi, nous nous sommes proposés d'évaluer la réaction de diazotation par spectroscopie RMN ¹H en fonction de la nature des substituants portés par l'aniline. Pour se faire, il a été choisi de comparer l'avancement de cette réaction avec différentes anilines substituées en position R₁ soit par un hydrogène soit par un groupement inductif donneur ou par un groupement inductif attracteur.

➤ Influence de la substitution en para par un acide carboxylique ou un iode

Afin de préjuger de l'effet inductif attracteur ou mésomère attracteur en *para* de l'aniline deux composés ont été sélectionnés et diazotés dans les mêmes conditions, à savoir en présence 1,1 équivalent de NaNO₂.

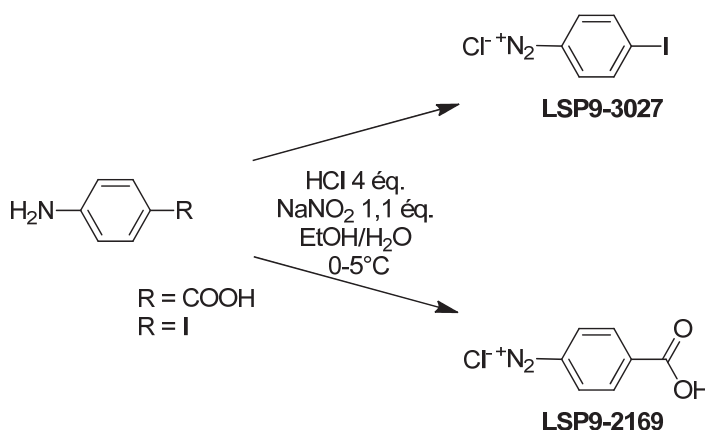


Schéma VII-44 : Voies de synthèse des composés LSP9-3027 et LSP9-2169

Ainsi la réaction de diazotation menée sur la 4-iodoaniline et sur l'acide 4-aminobenzoïque a permis l'accès à leur sels de diazonium respectivement les composés **LSP9-3027** et **LSP9-2169** après cinq minutes de réaction (**Schéma VII-44**).

L'étude des spectres RMN de ces composés diazotés montrent la présence de deux signaux de multiplicité identique entre les composés **LSP9-3027** et **LSP9-2169**. Le spectre de l'halogéno-diazonium est cependant plus blindé de 0,1 ppm.

465. Tunçel, M., *et al. Transition Met. Chem.* **2006**, 31, 805-812.

Ainsi, en présence d'1,1 équivalent de nitrite de sodium les sels de diazonium de la 4-iodoaniline et de l'acide 4-aminobenzoïque ont été obtenus. Ces informations laissent à penser que la nature des groupements portés en *para* de l'aniline n'a que peu d'influence sur la diazotation. Les effets électroniques de la fonction acide et ceux de l'iode aboutissent à un effet global identique. Des études réalisées avec des groupements mésomères accepteurs tels que les groupements nitro permettraient de conclure plus largement sur l'influence de la nature des substituants dans la réalisation de la réaction de diazotation.

Cette étude a été poursuivie par l'évaluation de la réactivité d'anilines portant des groupements R₁ de différente nature et leur implication dans la réaction de diazotation.

➤ Influence de la nature des groupements en ortho de l'amine

Afin d'évaluer l'influence des substituants portés en *ortho* de l'aniline, quatre molécules ont été sélectionnées et évaluées. Pour se faire, ces quatre composés ont été diazotés dans des conditions similaires à celles décrites précédemment, à savoir, en présence d'1,1 équivalent de NaNO₂ (**Schéma VII-45**).

Ainsi, après cinq minutes de réaction, le spectre RMN ¹H témoigne de la transformation totale en sel de diazonium de l'acide 2-méthyle-4-aminobenzoïque.

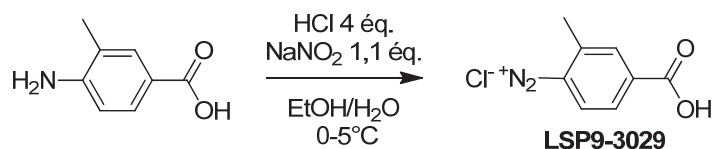


Schéma VII-45 : Voie de synthèse du composé LSP9-3029

L'acide 2-méthyle-4-aminobenzoïque est un composé partiellement soluble dans l'eau que ce soit à pH neutre ou à pH acide. De ce fait, la réaction de diazotation a été réalisée en solubilisant le réactif dans un mélange eau-éthanol (1-1).

Afin d'évaluer l'influence de groupements inductifs attracteurs, deux anilines portant un fluor ont été diazotées (**Schéma VII-46**).

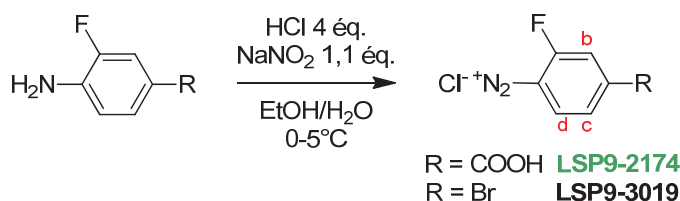


Schéma VII-46 : Synthèse des composés LSP9-2174 et LSP9-3019

Des observations identiques ont pu être effectuées pour les composés **LSP9-2174** et **LSP9-3019**, à savoir que les réactions n'ont pas été totales. Cette information est apportée par la présence de réactif identifié en RMN ¹H (**Figure VII-10**).

Ainsi, en présence d'1,1 équivalent de NaNO_2 et après cinq minutes de réaction, il reste 15 % d'acide 3-fluoro-4-aminobenzoïque et 20 % de 2-fluoro-4-bromoaniline. Les expériences RMN ^1H réalisées jusqu'à une heure après l'ajout de nitrite de sodium indiquent que la réaction de diazotation n'évolue plus.

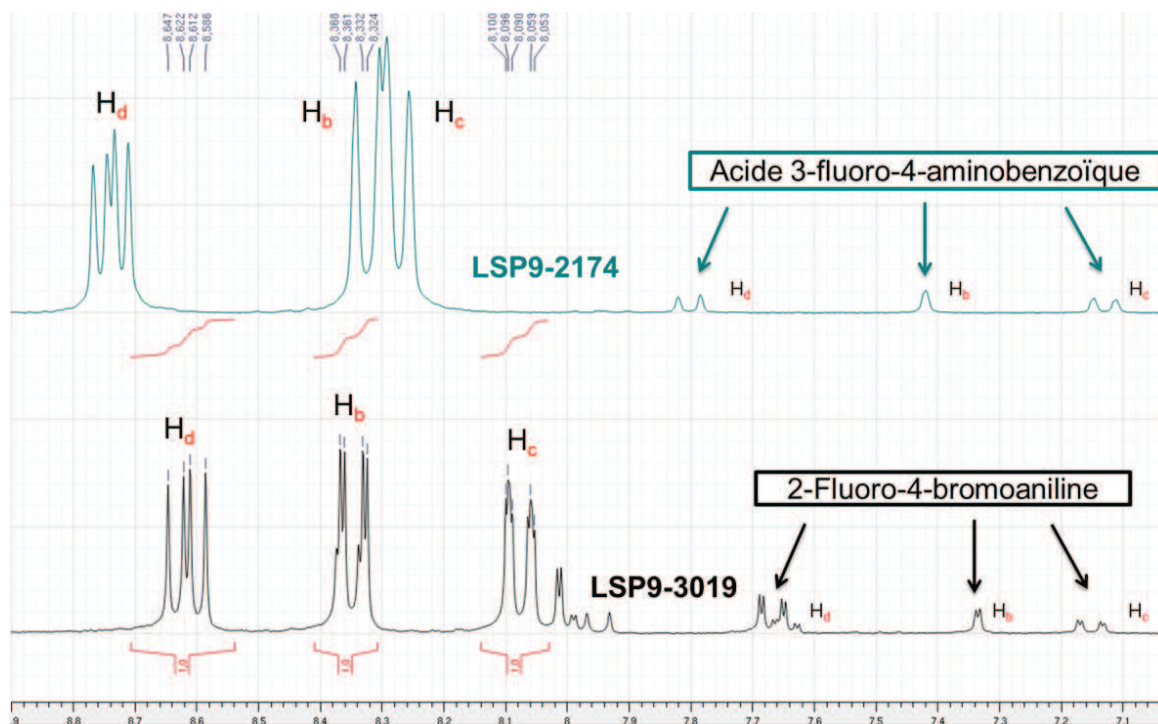


Figure VII-10 : RMN ^1H des composés LSP9-2174 et LSP9-3019

Au regard des résultats obtenus pour les composés substitués, par un groupement méthyl (**LSP9-2169**) ou un atome de fluor (**LSP9-2174**; **LSP9-2169**), il est possible d'observer que la présence d'éléments inductifs attracteurs en *ortho* de l'aniline diminue l'avancement de la réaction.

Afin d'évaluer l'influence de l'effet mésomère attracteur, une aniline portant deux groupements nitro connus pour leur effet très désactivant a été diazotée. Ainsi la 2,4-dinitroaniline a été diazotée avec 1,1 équivalent de nitrite de sodium. Dans ces conditions et après cinq minutes de réaction 70 % de 2,4-dinitroaniline sont converties en leurs sels de diazonium correspondant.

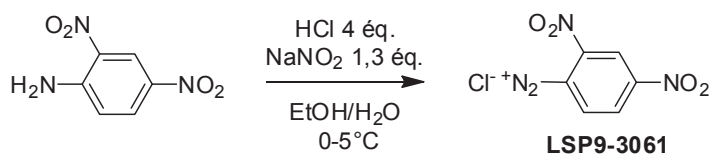


Schéma VII-47 : Méthodologie de synthèse des composés LSP9-3061

1,3 équivalent de NaNO_2 ont été nécessaires à la conversion totale du réactif en sels de 2,4-dinitrobenzènediazonium (**LSP9-3061**) après cinq minutes (**Schéma VII-47**, **Figure VII-11**).

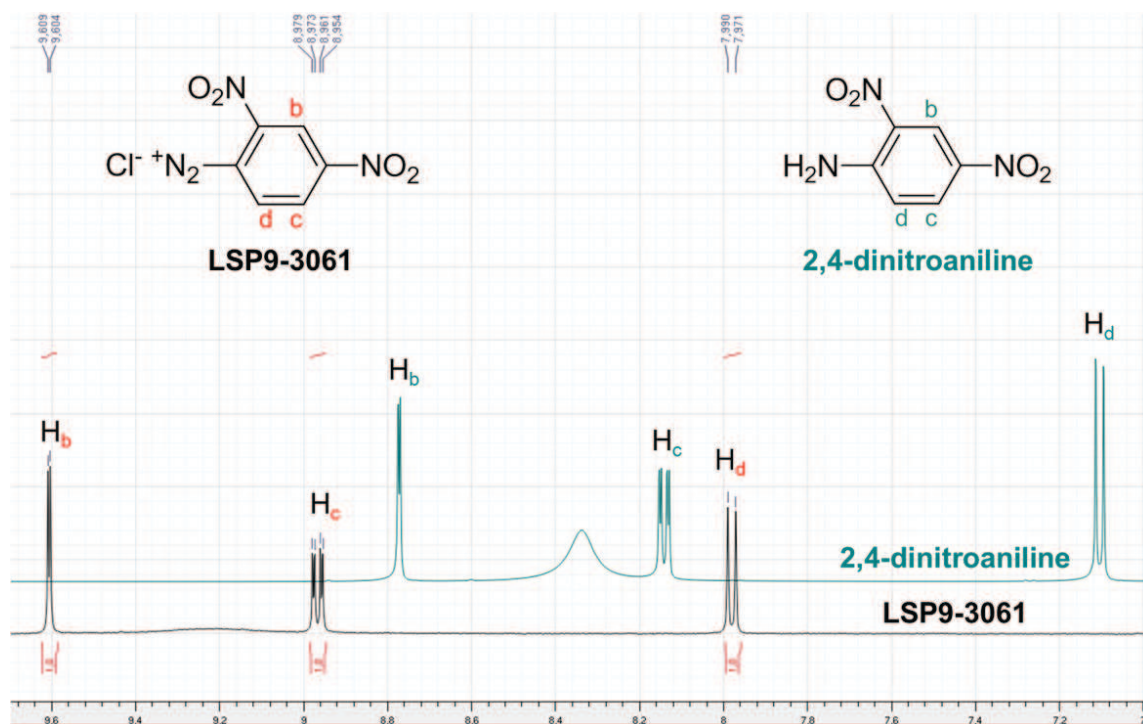
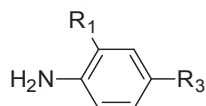
Figure VII-11 : RMN ^1H du composé LSP9-3061

Tableau VII-11 : Corrélation entre la valeur du pKa des anilines et le pourcentage de réactif restant après diazotation à 1,1 équivalent de nitrite de sodium



| R1 | R3 | pKa $\text{NH}_3^+/\text{NH}_2$ | % de réactif |
|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------|
| H | COOH | 4,6 | 0 |
| CH ₃ | COOH | 4,38 | 0 |
| F | COOH | 3,2 | 15 |
| F | I | 1,98 | 20 |
| CF ₃ | COOH | 0,55 | 15 |
| Cl | COOH | 2,62 | 10 |
| Cl | I | 1,69 | 10 |
| NO ₂ | NO ₂ | -4,3 | 30 |

Valeurs obtenues d'après Bordwell (www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable) et Sparc calculator (<http://archemcalc.com/sparc/>)

Ce travail de l'étude de la réactivité d'anilines substituées en *ortho* par des groupements de nature électronique différents, permet de montrer que la nature des substituants portés sur le cycle aromatique possède une influence importante sur la réactivité de l'amine aromatique.

Il a pu être noté que des substituants possédant un groupement attracteur, que ce soit inductif ou mésomère, en *ortho* de l'aniline diminue la réactivité de ces amines aromatiques pour la réaction de diazotation. Cette diminution semble être corrélée à une diminution des pKa de l'aniline. Afin de valider cette hypothèse, les valeurs des pKa de différentes anilines et la proportion de réactif, restant après réaction de diazotation en présence de 1,1 équivalent de NaNO₂, ont été comparées et résumées dans le **Tableau VII-11**.

Il est possible de remarquer que les réactions de diazotation engagées avec 1,1 équivalent de nitrite de sodium et avec des anilines ayant un pKa inférieur à 4 ne sont pas totales. Ainsi, les éléments inductifs attracteurs ou mésomères attracteurs vont appauvrir en électrons l'azote de l'aniline. Le doublet d'électrons sera alors moins nucléophile pour réagir avec l'ion nitrosonium (NO⁺), espèce réactive de l'acide nitreux (**Schéma VII-41**). De la même manière, une corrélation peut être établie entre le pKa et la solubilité dans l'eau des anilines. En fait, le doublet de l'azote étant moins mobilisable, il pourra plus difficilement interagir avec l'eau et conduire à la formation de l'anilinium.

VII.2.c.iii Evaluation de la réaction de diazotation et de monodiazotation d'analogues de benzidine

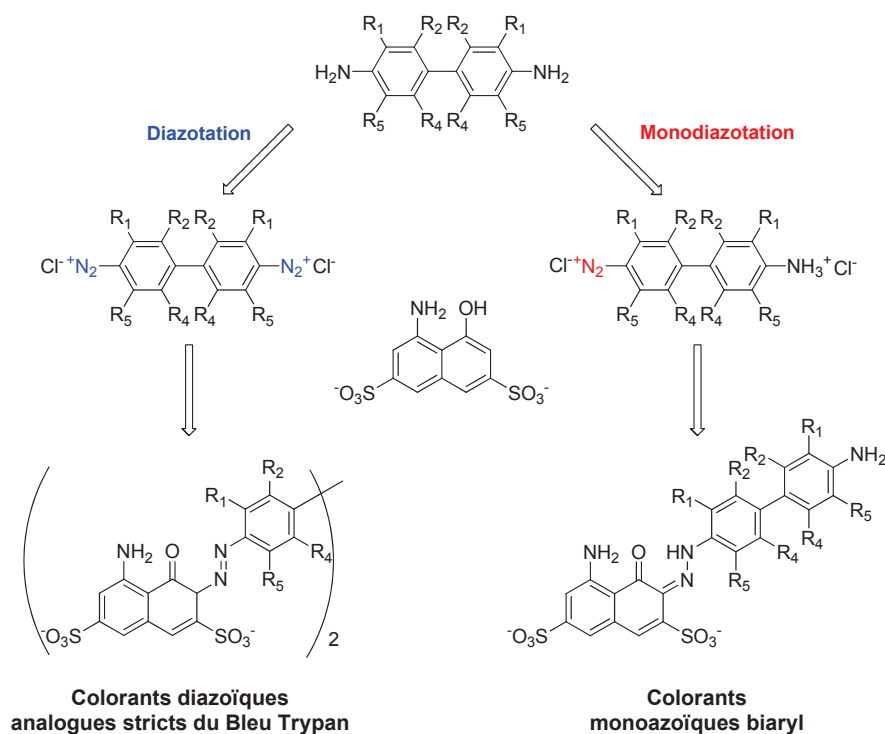


Schéma VII-48 : Schéma rétrosynthétique des colorants diazoïques et monoazoïques biaryles

Afin de développer des analogues du Bleu Trypan, il nous a semblé intéressant d'évaluer les paramètres de diazotation permettant l'accès aux analogues stricts du Bleu Trypan et ceux qui conduisent à l'obtention de colorants monoazoïques biaryles. Pour se faire, la réactivité d'analogues de benzidine a été évaluée (**Schéma VII-48**).

➤ *Evaluation de la réaction de diazotation de la tolidine par RMN*

Ainsi, la réaction de diazotation de ce composé a été étudiée par spectroscopie RMN ^1H . Afin d'étudier l'avancement de la réaction, le nitrite de sodium est ajouté par fraction de 0,2 équivalent. Par ce biais, il est possible de suivre l'évolution de la formation parallèle de la tolidine mono- et di-diazotée proportionnellement à la consommation du réactif.

Pour chaque ajout, plusieurs spectres RMN sont réalisés entre t_0 et t_{+10} (minutes) afin d'apprécier l'évolution de la diazotation (**Schéma VII-49**).

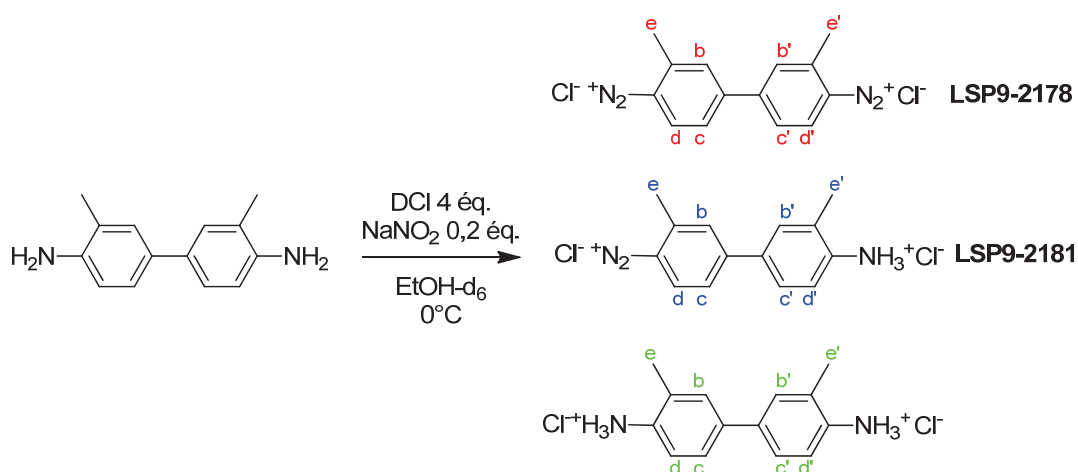


Schéma VII-49 : Synthèse du composé LSP9-2178 suivie par RMN ^1H

Dès l'ajout de 0,2 équivalent de nitrite de sodium, le spectre proton témoigne de la présence de trois composés : le composé monodiazoté, le didiazoté et le réactif (**Figure VII-12**).

Le spectre du composé didiazoté présente trois signaux caractéristiques : un doublet fortement déblindé à 8,83 ppm correspondant aux protons H_d-H_{d'}, un singulet à 8,37 ppm correspondant aux protons H_b-H_{b'} et un doublet à 8,25 ppm pour les protons H_c-H_{c'}. En toute vraisemblance, le spectre du composé monodiazoté est dédoublé avec trois signaux déblindés, correspondant aux protons du cycle portant le diazo, et trois signaux plus blindés pour les protons portés par le cycle de l'aniline (**Figure VII-12**). De façon plus triviale, le suivi de l'avancement de la réaction peut se faire par le suivi de l'évolution des signaux correspondants aux protons des méthyles H_e et H_{e'} qui sont caractéristiques des formes mono- et di-diazotées ainsi que de la tolidine.

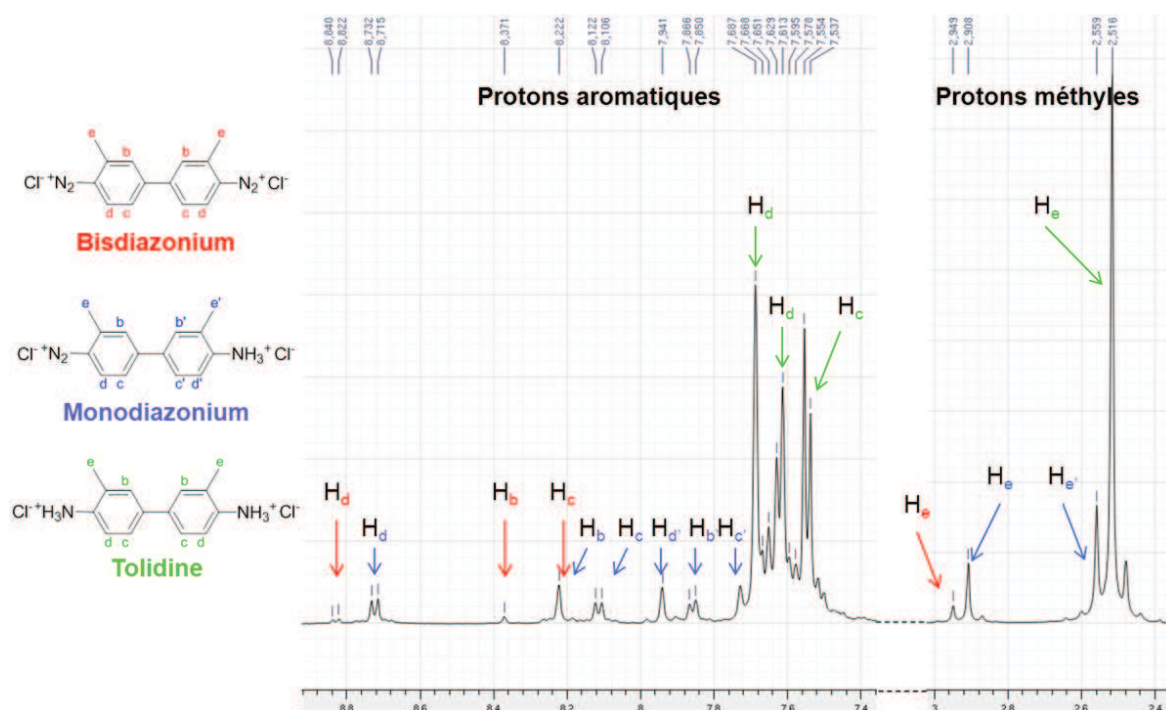


Figure VII-12 : RMN ^1H du composé LSP9-2178 après ajout de 0,2 équivalent de NaNO_2

A 2 équivalents de NaNO_2 , le réactif est entièrement consommé et le spectre RMN témoigne de la présence de produit didiazoté majoritaire et d'une faible proportion de monodiazoté (Figure VII-13). L'obtention du composé LSP9-2178 n'est possible qu'après 2,2 équivalents de nitrite de sodium (Figure VII-13).

Le suivi de réaction de diazotation par RMN ^1H a permis de montrer que l'obtention du composé en *ortho* de l'aniline par un groupement méthyle (LSP9-2178) se réalise de façon séquentielle. Dans un premier temps, il y a formation du monodiazonium de tolidine qui réagit ensuite avec le nitrite de sodium pour tendre à former un sel de di-diazonium. Un parallèle peut alors être fait quant à la diazotation de l'acide 2-méthyl-4-aminobenzoïque, présentant une seule fonction aniline et 1,1 équivalent de NaNO_2 (Schéma VII-45) et la didiazotation de la tolidine requiert 2,2 équivalents (Figure VII-13).

De plus, cette analyse a ouvert la voie au développement de sels de monodiazonium de dérivés de benzidine.

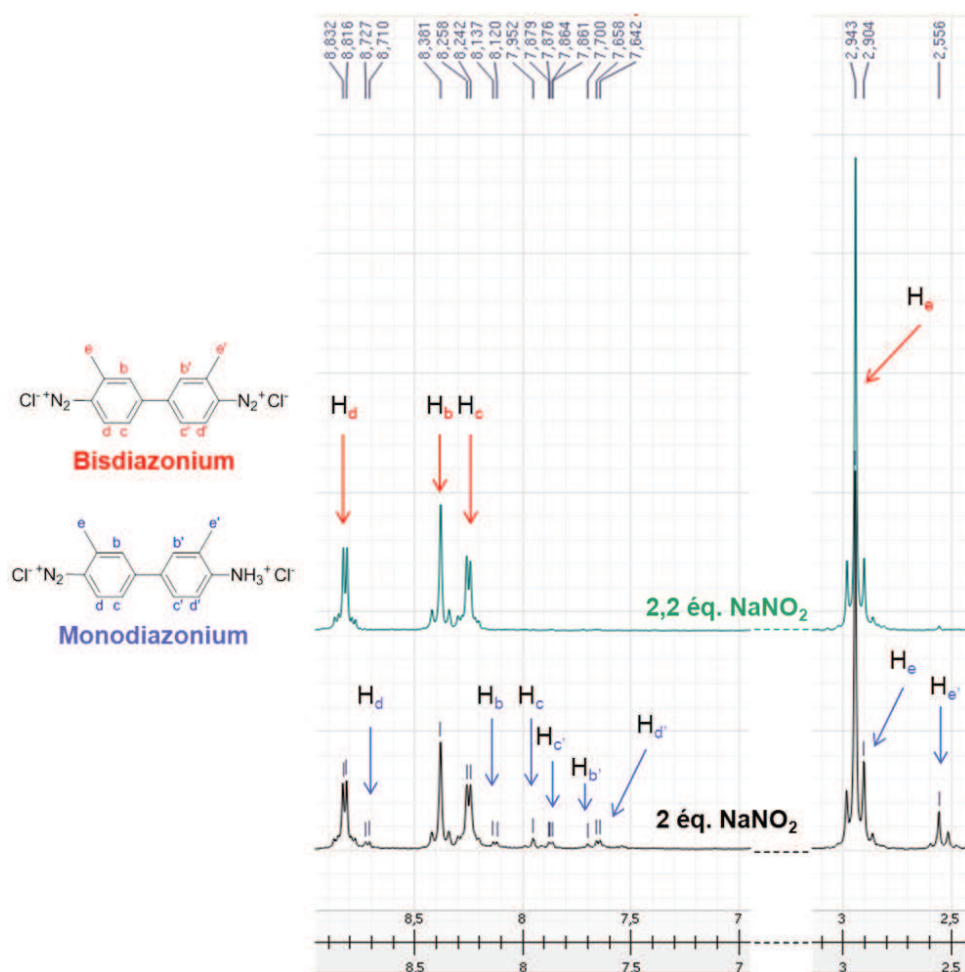


Figure VII-13 : RMN ^1H du composé LSP9-2178 après ajout de 2 et 2,2 équivalents de NaNO_2

VII.2.c.iv Monodiazotation de dérivés de benzidine

➤ Influence des groupements inductifs attracteurs en ortho de l'aniline

Les groupements inductifs attracteurs possèdent un effet désactivant sur le doublet de l'azote quand ils sont situés en *ortho* sur des acides aminobenzoïques et des halogéno-anilines.

Afin d'appréhender la synthèse de sels de monodiazonium de dérivés de benzidine portant des substituants inductifs attracteurs en position R_1 , la monodiazotation à 0°C dans l'éthanol a été réalisée pour deux dérivés possédant des halogènes (**Schéma VII-50**).

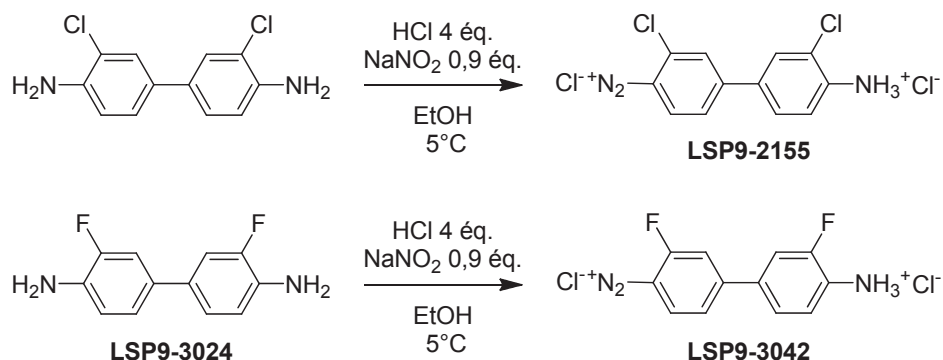


Schéma VII-50 : Méthodologie de synthèse des composés LSP9-2155 et LSP9-3042

Pour se faire, les deux dérivés de benzidine ont été diazotés par paliers successifs de 0,1 équivalent de nitrite de sodium et l'évaluation de la réaction est monitorée par RMN ^1H . Pour les deux composés **LSP9-3042** et **LSP9-2155** jusqu'à 0,9 équivalent ajouté, aucune formation de composé bisdiazoté n'est observée.

Ces molécules ont été obtenues pures après extraction de manière à enlever l'excès de réactif. Cette extraction est réalisée à pH acide dans le but d'éviter de dégrader la fonction diazonium par les ions OH^- , tel que cela a été décrit précédemment (**Schéma VII-42**).

La 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

L'avancement de la réaction de monodiazotation de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine a été évaluée (**Figure VII-14**).

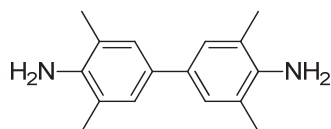


Figure VII-14 : Structure de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

Pour se faire, la réaction a été suivie par spectrométrie RMN (**Figure VII-15**).

Dès l'ajout de 0,1 équivalent, il est possible d'observer la formation de composé bisdiazoté et du composé monodiazoté.

Différentes conditions de dilution et de température (0°C , -10°C , -20°C , -40°C) ont été évaluées mais aucune n'a permis l'accès à un sel de monodiazonium de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine.

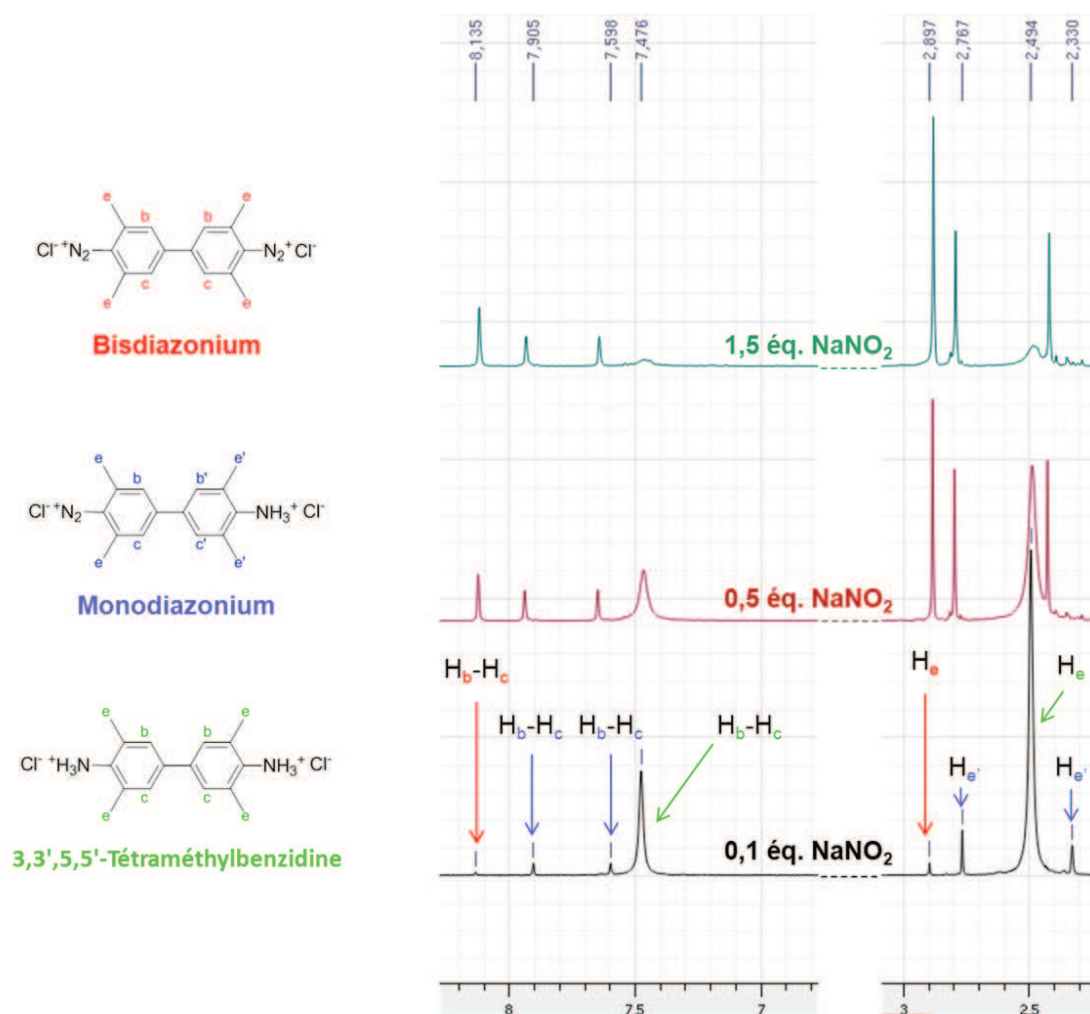


Figure VII-15 : Suivi RMN ^1H de l'évolution de la réaction de diazotation de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

La dianisidine

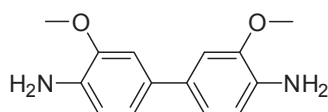


Figure VII-16 : Structure de la dianisidine

De la même manière que pour le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine, la diazotation de l'*ortho* dianisidine a été évaluée (Figure VII-16). Pour les différents essais de température réalisés, le monodiazonium de la dianisidine n'a pu être isolé.

Conclusions

Les essais de monodiazotation de dérivés de benzidine portant des groupements inductifs donneurs ou mésomères donneurs n'ont pas permis l'accès à des composés ne présentant qu'une seule fonction diazonium. Ces résultats confirment que la présence de ces groupements a tendance à augmenter la nucléophilie du doublet d'électrons porté par l'azote de la fonction amine et rejoignent les conclusions qui ont pu être apportées sur la réactivité des anilines halogénées et acides carboxyliques. Ainsi, ce doublet sera alors plus réactif et pourra plus facilement réagir avec l'ion nitrosonium pour conduire au sel de diazonium (**Schéma VII-41**).

Grâce à ces propriétés, la monodiazotation de dérivés de benzidine portant des substituants inductifs attracteurs a été concluante et a permis l'accès aux composés désirés.

➤ Protection d'une fonction amine des dérivés de benzidine

Afin d'avoir accès aux dérivés de benzidine ayant des groupements R_1 inductifs ou mésomères donneurs et possédant une seule amine libre pouvant être diazotée, nous avons choisi de réaliser des protections orthogonales de ces molécules :

- une protection sélective d'une seule aniline par du *tert*-butoxycarbonyle (Boc),
- suivie d'une protection de la seule amine libre restante par le groupement fluorénylméthoxycarbonyle (Fmoc) (**Schéma VII-51**).

Le choix des groupements protecteurs a été réalisé pour répondre aux exigences de la réaction de diazotation puis de la réaction de copulation azoïque. Ainsi, il a été choisi de réaliser une monoprotection de la benzidine au Boc_2O suivie d'une protection au Fmoc-Cl. Le groupement Fmoc-Cl a été choisi en raison de sa résistance aux pH acides, pH auxquels la réaction de diazotation est réalisée. De plus, cette protection temporaire ne résistant pas aux pH basiques, il a été envisagé de pouvoir déprotéger l'amine n'ayant pas été diazotée *in situ* lors de la copulation à pH 9.

Cette voie de synthèse a été choisie car les premiers essais de monoprotection au Fmoc-Cl n'ont pas été concluants et ont conduit à l'obtention de composés diprotégés.

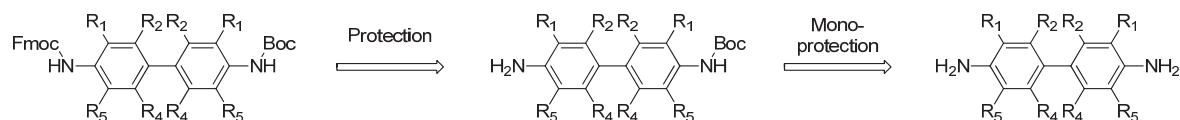
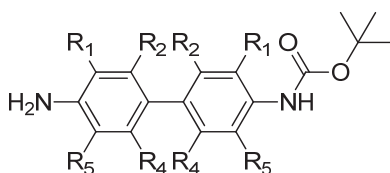


Schéma VII-51 : Schéma rétrosynthétique de protection des dérivés de benzidine

Mono-protection au Boc

La protection est réalisée en présence de Boc_2O (1 équivalent) et d'une base, la N,N-diisopropylethylamine (DIEA). Ainsi, trois molécules peuvent être alors isolées après purification. La première molécule est le composé di-protégé (rendement de 10 à 30%), le deuxième correspond au composé monoprotégé (**Tableau VII-12**) puis le dernier produit est le réactif n'ayant pas réagi.

Les résultats des réactions de monoprotection avec le groupement *tert*-butoxycarbonyle sont résumés dans le **Tableau VII-12**.

Tableau VII-12 : Résultats des monoprotections au Boc_2O de benzidines

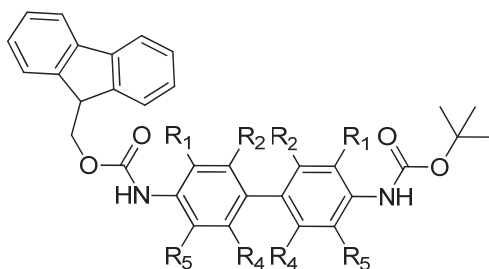
| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₄ | R ₅ | Rendements |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| LSP9-1157 | CH ₃ | H | H | H | 40 % |
| LSP9-1160 | Cl | H | H | H | 30 % |
| LSP9-1162 | H | H | H | H | 45 % |
| LSP9-1167 | CH ₃ | H | H | CH ₃ | 23 % |
| LSP9-1172 | F | F | F | F | 35 % |
| LSP9-1175 | CF ₃ | H | H | H | 25 % |
| LSP9-1176 | F | H | H | H | 25 % |

Protection au Fmoc-Cl

Les composés précédents ont ensuite été engagés dans une réaction de protection avec du Fmoc-Cl (1,1 équivalent) en présence de carbonate de sodium. Après extraction, les composés diprotégés sont obtenus sous forme d'une poudre blanche ne nécessitant pas de purification supplémentaire.

Les résultats des réactions de protection avec le groupement *tert*-butoxycarbonyle sont résumés dans le **Tableau VII-13**.

Tableau VII-13 : Résultats des protections des benzidines monoprotégées au Fmoc-Cl



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₄ | R ₅ | Rendements |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| LSP9-1159 | CH ₃ | H | H | H | 68 % |
| LSP9-1163 | H | H | H | H | 51 % |
| LSP9-1178 | CH ₃ | H | H | CH ₃ | 99 % |

Conclusions

L'obtention de ces composés témoigne de la possibilité de mono-fonctionnaliser une seule des deux amines des dérivés de benzidine. Cependant, les rendements globaux après deux étapes ne sont guère supérieurs à 20 %. De la même manière que lors de la synthèse des sels de diazonium, il est possible d'observer que les groupements inductifs donneurs augmentent la réactivité du doublet d'électrons des anilines et donc facilitent aussi la réalisation des réactions de protection de ces amines aromatiques. Ces composés peuvent alors être engagés directement dans une réaction de diazotation, réaction qui permettra de libérer l'amine protégée par le groupement Boc *in situ* et ainsi permettre d'éviter une étape de déprotection.

VII.2.c.v Conclusions

L'étude de la réaction de diazotation a permis de mettre en exergue l'influence de certains paramètres sur l'avancement de la réaction comme l'influence des substituants portés par le composé à diazoter. Ces groupements agissent directement sur la réactivité des anilines et leur solubilité. Ainsi, des réactions de diazotation sélective d'une amine ont été entreprises. Cependant, l'influence de substituants inductifs donneurs n'a pas permis de monodiazoter certains analogues de benzidine. Pour se faire, une méthodologie de protection orthogonale d'aniline a été développée ouvrant la voie au développement de nouveaux colorants monoazoïques. Ce travail d'étude de la diazotation a permis d'appréhender les conditions nécessaires pour la diazotation d'anilines et de benzidines fonctionnalisées.

VII.2.d Couplage azoïqueVII.2.d.i Introduction

La réaction de couplage azoïque est l'étape d'accès aux molécules dérivées de Bleu Trypan qui permet d'établir une liaison azo entre un sel de diazonium et un naphthalène-sulfonique (**Schéma VII-52**).

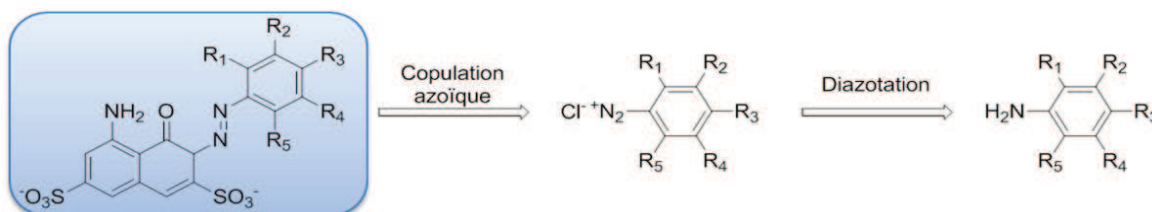


Schéma VII-52 : Synthèse de colorants azoïques : la copulation azoïque

➤ Généralités et données sur le couplage azoïque

La réaction de couplage azoïque, aussi connue sous le nom de copulation azoïque, est une réaction d'addition d'un sel de diazonium électrophile sur un cycle aromatique nucléophile *via* une réaction de substitution électrophile aromatique (SE_{Ar}). Cette réaction conduit à l'obtention de colorants azoïques aromatiques généralement présentés sous la formule de type $Ar-N=N-Ar'$.

De par l'importance de ces colorants, notamment en industrie, ces molécules ont fait l'objet de nombreuses études depuis le début du XX^{ème}. Les différents paramètres de cette réaction ont été et sont toujours étudiés afin de mieux comprendre le mécanisme de couplage. Il apparaît que le pH, l'encombrement stérique du nucléophile et les substituants portés par le cycle naphthalène-sulfonique ainsi que ceux portés par le sel de diazonium influencent la réaction de diazotation.

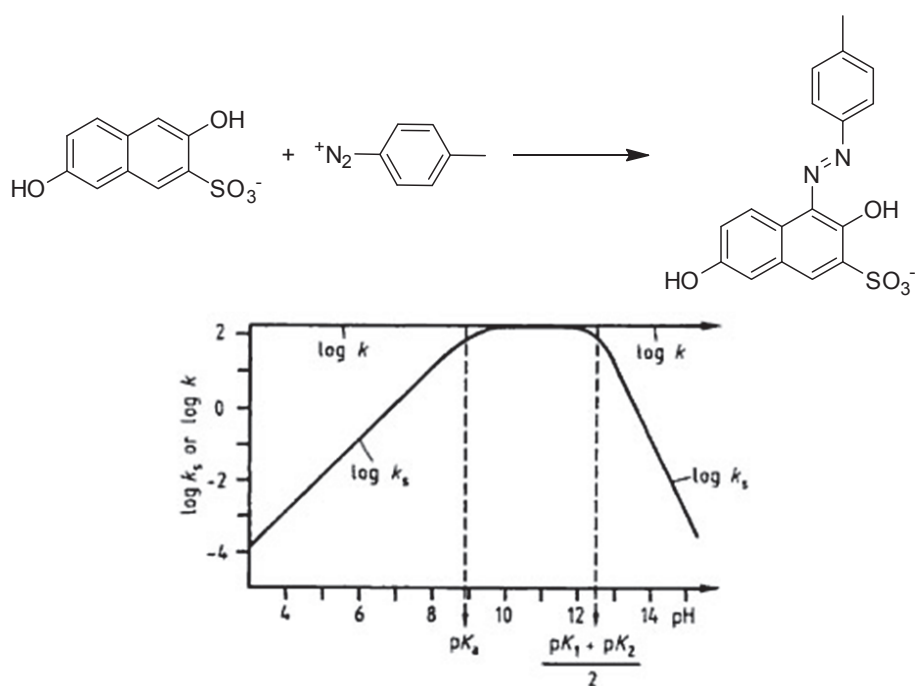
➤ Le pH

Dans les années 1950, Zollinger *et al.* et Wittwer *et al.* ont étudié les paramètres de couplage entre l'ion du 4-diazonium-*p*-toluène et l'acide 2,6-dihydroxynaphtalène-1-sulfonique. Ils ont pu montrer que le ratio de couplage est pH-dépendant (**Figure VII-17**).^{466, 467}

En effet, le pKa du phénol étant de 8,94 et pour des pH descendants dans la zone acide, l'équilibre est déplacé vers une forme peu nucléophile $Ar-OH$. Cette acidité a pour principal effet de diminuer la quantité de nucléophiles et ainsi diminuer le taux de couplage conduisant au composé azoïque.

466. Zollinger, H., *et al. Helv. Chim. Acta.* **1952**, 35, 1209-1223.

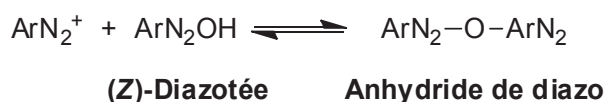
467. Wittwer, C., *et al. Helv. Chim. Acta.* **1954**, 37, 1954-1968.



K_s : Constante du ratio de couplage

Figure VII-17 : Ratio de couplage azoïque entre l'ion du 4-méthylanilinium et l'acide 3,7-dihydroxynaphtalène-2-sulfonique dépendant du pH d'après Zollinger et Wittwer^{466, 467}

Chose plus surprenante, pour des pH supérieurs à 13, le taux de couplage est dépendant de la concentration en ion OH^- . Ainsi, il semblerait que ces ions agissent par compétition sur le diazonium et forment une espèce dite (Z)-diazotée. Cette entité a d'ailleurs tendance à former de l'anhydride de diazo (Equation VII-4).



Equation VII-4 : Equilibre entre la forme (Z)-diazotée et l'anhydride de diazo d'après Zollinger⁴⁶⁸

En 1983, Szele *et al.* ont comparé les formes énoles et énolates quant à leur capacité nucléophile en tant qu'agent de couplage.⁴⁶⁹ Ainsi, les énols sont 10^8 - 10^9 fois moins réactifs que leurs phénolates respectifs. Ces valeurs ont été précisées par l'étude du couplage de l'acide 2-hydroxynaphtalène-3,6-disulfonique avec le sel de diazonium de la 2-aminothiazole. Ainsi, le phénolate de cet amino-naphtol s'est révélé être $4 \cdot 10^8$ - $8 \cdot 10^8$ plus réactif que l'énol.⁴⁷⁰

468. Zollinger, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 141-150.

469. Szele, I., *et al.* **1983**, Vol. 112, pp 1-66.

470. Diener, H., *et al. Helv. Chim. Acta.* **1989**, 72, 800-805.

Cependant, le pH n'influence pas seulement le taux de couplage mais il détermine surtout la régiosélectivité. Ainsi dans la littérature, le couplage diazoïque de l'acide 6-amino-4-hydroxynaphtalène-2-sulfonique (γ -acide) en milieu acide conduit à un colorant substitué en position 5 alors qu'en milieu basique il est possible d'observer un mélange de composés substitués en position 1 et 3 (**Figure VII-18**).^{471, 472}

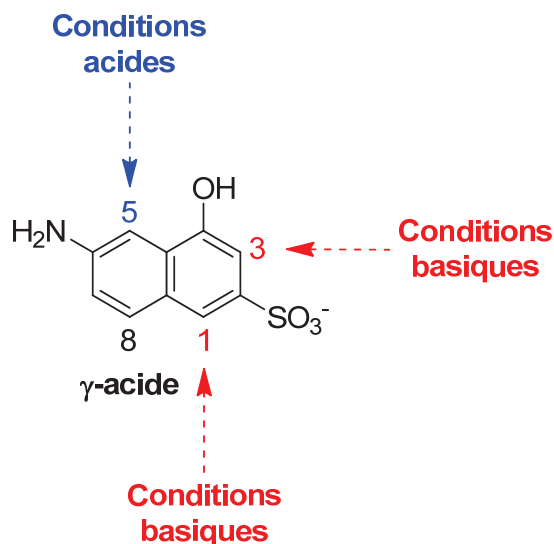


Figure VII-18 : Orientation théorique de la copulation en fonction du pH sur la γ -acide d'après Panchartek *et al.* et Kaminski *et al.*^{31, 32}

Aucune substitution sur les positions 7 et 8 n'a pu être observée, que ce soit en condition de couplage alcaline ou acide. Ainsi, il est alors possible de remarquer qu'à pH basique la copulation se réalise sur le cycle portant la fonction alcool et non la fonction amine.

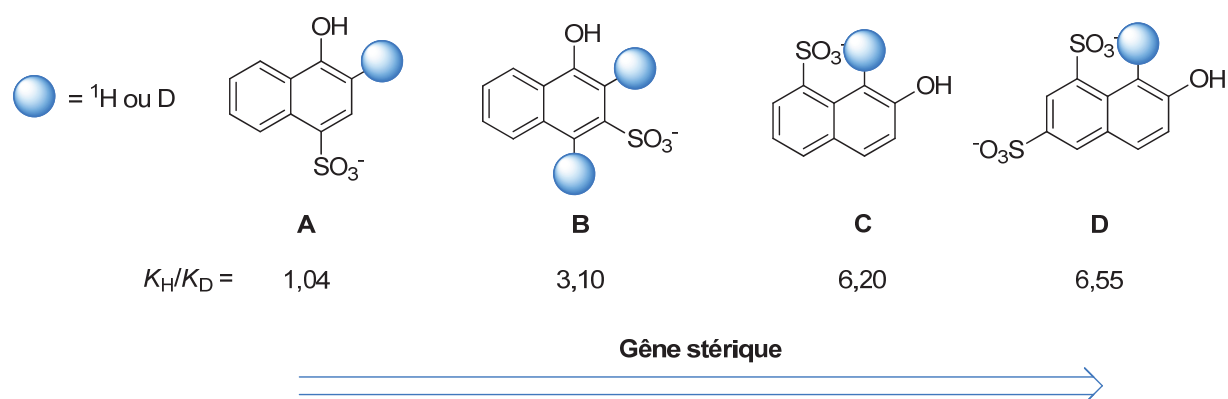
➤ L'encombrement stérique

En 1964, Zollinger a publié son travail sur l'étude de la gêne stérique lors de la copulation.⁴⁷³ Cette étude a consisté à évaluer l'effet de l'hydrogène (^1H) et du deutérium (D) vis-à-vis de réactions de couplage azoïque avec différents hydroxynaphtalènes (**Figure VII-19**).

Il est possible de noter que pour les molécules **C** et **D**, le groupement sulfonique volumineux est en position *péri* du centre réactif. Cette position *péri* gêne alors l'arrachement du proton par une base nécessaire à la réaromatisation du cycle. Pour la molécule **B**, le groupement sulfonate n'est pas en position *péri* mais *ortho*, ce qui implique une diminution de la gêne stérique ainsi pour le départ plus aisé du proton assisté par une base. La gêne stérique sur le composé **A** est, quant à elle, quasi nulle puisque le sulfonate, en *para*, est assez loin du carbone sur lequel se fait la substitution.

471. Panchartek, J., *et al.* *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1968**, 33, 894.

472. Kaminski, R., *et al.* *Helv. Chim. Acta.* **1983**, 66, 2002-2017.



$K_{\text{H}}/K_{\text{D}}$: mesure quantitative de l'effet isotopique pour l'évaluation de la gêne stérique

Figure VII-19 : Evaluation de la gêne stérique mesure cinétique de l'effet de l'hydrogène et du deutérium dans le couplage d'aryldiazonium avec différents acides hydroxynaphtalène-sulfoniques d'après Zollinger⁴⁷³

➤ Stabilisation de la structure

Dans la littérature, les colorants azoïques sont parfois décrits sous leur forme hydrazone.^{474, 475}

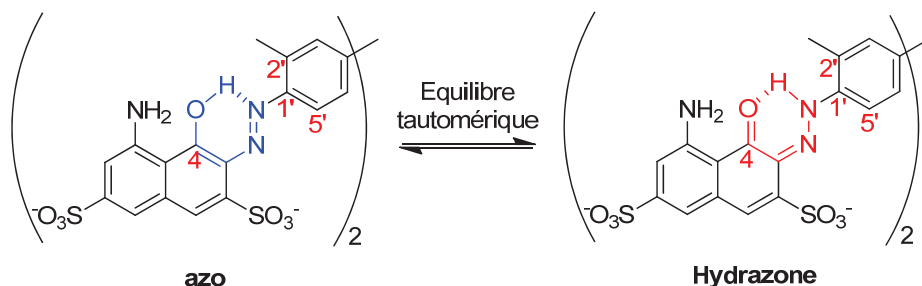


Schéma VII-53 : Equilibre tautomérique azo hydrazone du Bleu Trypan

En effet, ces molécules peuvent exister sous deux formes tautomères (**Schéma VII-53**). La formation de l'hydrazone et d'un pseudo cycle à six chaînons par liaisons hydrogènes intramoléculaires induit une conformation coplanaire aux colorants qui stabilise la molécule.^{474, 475}

La forme hydrazone peut être caractérisée par spectroscopie RMN réalisée en présence de DMSO-d_6 , solvant permettant de caractériser les protons échangeables. Par exemple la forme hydrazone peut être identifiable par plusieurs informations sur le spectre du Bleu Trypan.

Le spectre ^1H témoigne de la présence d'un proton fortement déblindé à 15,62 ppm. En RMN ^{13}C , le carbone C_4 a un déplacement de 181,4 ppm caractéristique d'une cétone aromatique. De plus, les expériences de corrélations proton-carbone à longue distance (HMBC) permettent d'observer une

473. Zollinger, H. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1964**, 2, 163-200.

474. Gordon, P. F., *et al.* **1983**, pp 96-108.

475. Kim, Y. D., *et al.* *Dyes Pigments.* **2011**, 89, 1-8.

corrélation entre le proton déblindé et le carbone C₄ en $^4J_{H-C}$, en $^2J_{H-C}$ avec le carbone C_{1'} et en $^3J_{H-C}$ avec le carbone C_{2'} et C_{5'}.

Il semblerait que l'implication de la fonction hydrazone dans une liaison hydrogène intramoléculaire favorise une conformation thermodynamiquement plus stable de ces molécules et diminue la décomposition de ces colorants par la lumière.^{476, 477}

Par ces informations, il est possible de noter que cette réaction de SE_{Ar} est sensible à certains facteurs comme le pH qui permet de moduler l'orientation de la substitution.

VII.2.d.ii Evaluation de l'orientation de la substitution électrophile aromatique

➤ Problématique

Le développement d'analogues du Bleu Trypan est possible par réaction de copulation diazoïque en milieu alcalin entre un amino-naphtol, l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique et un sel d'aryldiazonium.^{465, 478-487}

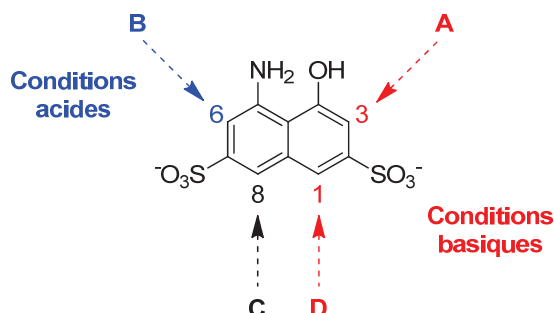


Schéma VII-54 : Différentes orientations de SE_{Ar} possibles en fonction du pH et de la nature des substituants

Sur cet acide, la copulation peut avoir lieu sur quatre positions. Dans la littérature, l'orientation de la réaction à pH basique est décrite comme se réalisant exclusivement selon la voie A, c'est-à-dire sur le carbone C₃.^{465, 480, 482, 486, 487} Pourtant, en raison du caractère mésomère donneur de la fonction énol, l'orientation de la réaction est probable en *ortho* (voie A) et en *para* (voie D) de cette fonction. De la même manière, le doublet non-liant de l'azote de la fonction naphtylamine confère à ce groupement un caractère

476. Sayed, M. B., *et al. Thermochim. Acta.* **1992**, 198, 21-31.
 477. Sakong, C., *et al. Dyes and Pigments.* **2011**, 88, 166-173.
 478. Bello, K. A., *et al. Dyes Pigments.* **2000**, 46, 121-128.
 479. Szadowski, J., *et al. Dyes Pigments.* **2001**, 50, 87-92.
 480. Gong, G. L., *et al. Dyes Pigments.* **2002**, 53, 109-117.
 481. Akerman, D., *et al. Dyes Pigments.* **2003**, 59, 285-292.
 482. Smith, B., *et al. Color. Technol.* **2006**, 122, 187-193.
 483. Wang, J. L., *et al. Color. Technol.* **2007**, 123, 39-45.
 484. Bone, J. A., *et al. Color. Technol.* **2008**, 124, 117-126.
 485. Morris, K. F., *et al. Color. Technol.* **2008**, 124, 186-194.
 486. Wang, L. M., *et al. Dyes Pigments.* **2008**, 76, 636-645.
 487. Song, D. H., *et al. Dyes Pigments.* **2009**, 80, 219-225.

mésomère donneur qui oriente en *ortho* et en *para* de la même manière qu'un émol. Pourtant, aucune substitution à pH basique n'est décrite sur ces positions de l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique. Par contre, cette réaction se réalise exclusivement sur le carbone C₆ (voie B) en condition acide et aucune SE_{Ar} ne prend place en *para* de la naphtylamine (voie C) (**Schéma VII-54**).^{480, 482, 486} En revanche, d'autres sites de copulation ont pu être observés sur des motifs naphthalène-sulfoniques présentant des substituants différents.

Au regard des informations précédemment décrites, la copulation azoïque peut se réaliser sur quatre positions. Afin d'étudier les paramètres de cette réaction de copulation azoïque, nous nous sommes proposés d'évaluer la régiosélectivité de la copulation azoïque sur des motifs simplifiés. Pour se faire, l'orientation à pH 9 a été évaluée sur quatre dérivés d'acides naphthalène-sulfoniques fonctionnalisés. Les informations recueillies lors de cette étude ont permis de pouvoir mieux appréhender la régiosélectivité de l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique. Dans un souci d'évaluation des produits secondaires pouvant se former lors de la réaction de copulation azoïque en présence d'excès de nitrite de sodium, ce naphthalène-sulfonique a été utilisé en tant qu'agent électrophile et non nucléophile comme c'était le cas jusqu'à présent dans la formation de colorants azoïques.

➤ Copulation azoïque de dérivés acides naphthalène-sulfoniques fonctionnalisés à pH basique

Pour se faire, l'orientation à pH 9 a été évaluée sur quatre dérivés d'acides naphthalène-sulfoniques fonctionnalisés (**Figure VII-20**).

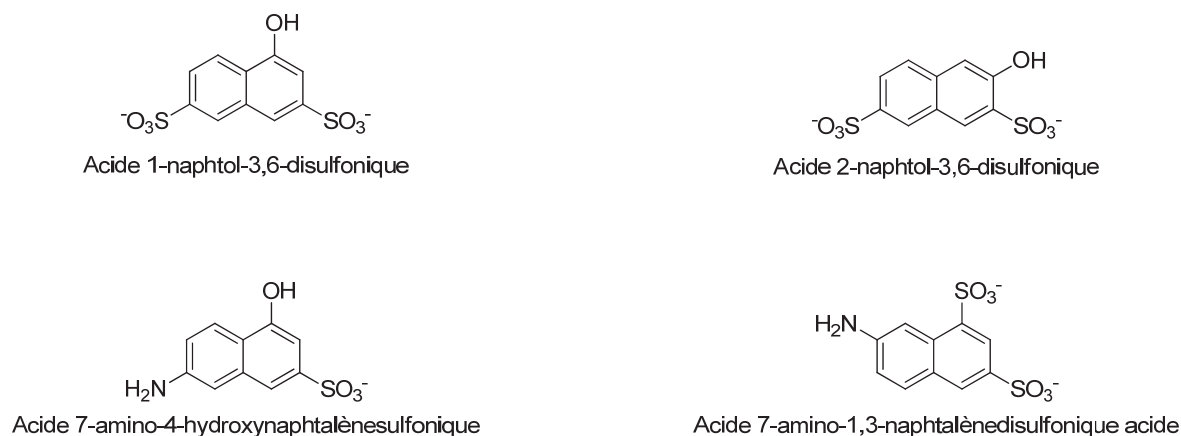


Figure VII-20 : Acides naphthalène-sulfoniques sélectionnés pour l'étude de l'orientation de la copulation azoïque

Le choix de ces naphthalène-sulfoniques permet d'appréhender la régiosélectivité de la copulation azoïque sur des composés possédant des fonctions acides sulfoniques, phénol et ou naphtylamine.

Ces quatre réactifs ont été engagés dans une réaction de copulation azoïque en présence du sel de diazonium de la 2-chloro-4-idoaniline (**Schéma VII-55**).

Afin de pouvoir discriminer le lieu de la SE_{Ar}, il a fallu croiser les informations obtenues par les spectres RMN à une dimension, proton et carbone, ainsi que celles obtenues par les études des corrélations à deux dimensions protons-protons (COSY), proton-carbone courte distance (HMQC), proton-carbone longue

distance (HMBC) et proton-proton dans l'espace (NOESY). Seules les informations pertinentes permettant de discriminer le lieu du couplage seront mentionnées. Dans un souci de simplicité, une numérotation identique des carbones sera conservée pour les différents colorants étudiés et est représentée sur la **Figure VII-21**.

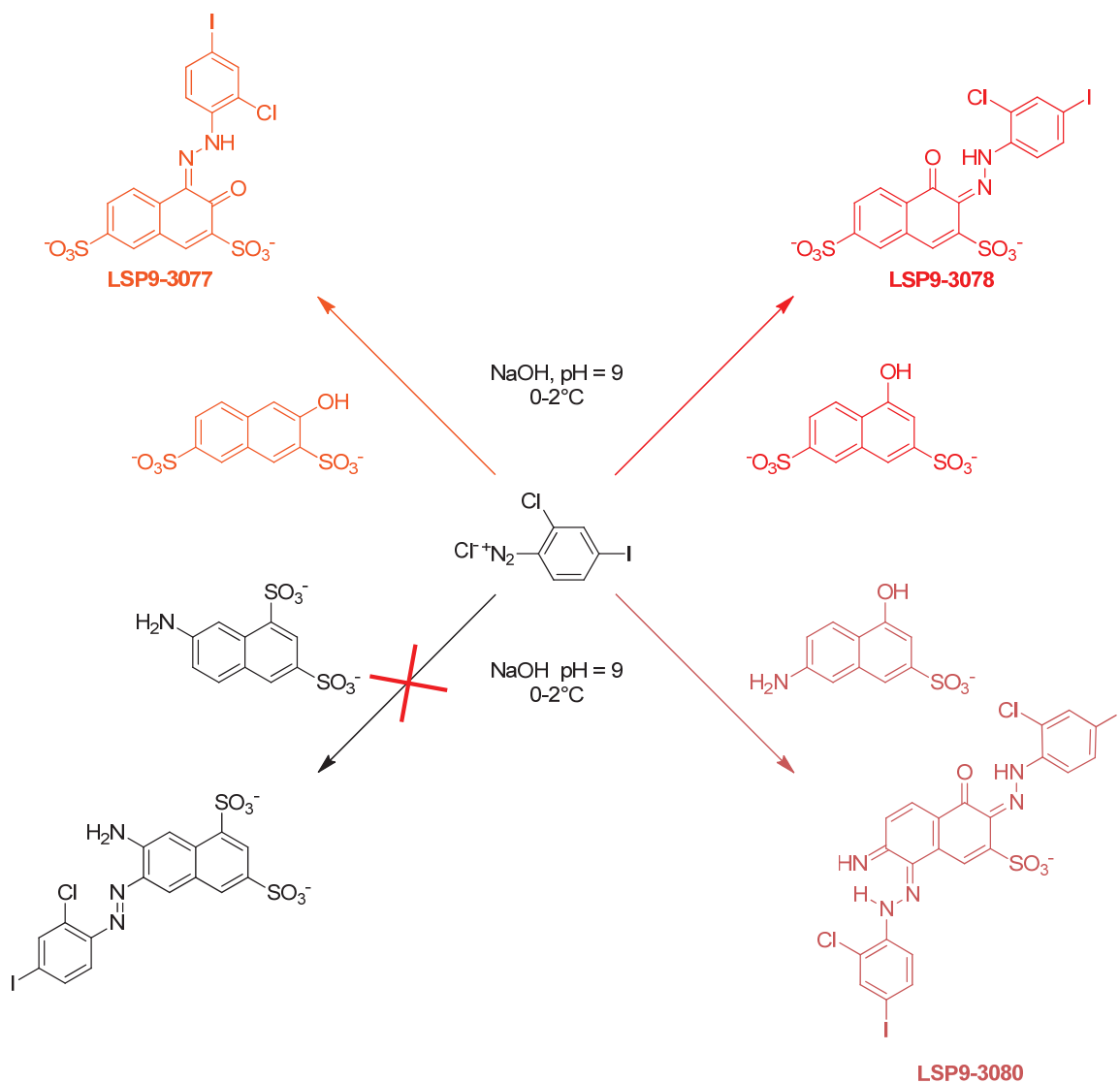


Schéma VII-55 : Méthodologie de synthèse de colorants à pH basique

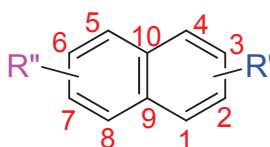


Figure VII-21 : Numérotation des atomes des colorants

Sur les quatre réactions engagées, trois ont permis l'accès à des colorants azoïques.

Copulation en ortho de l'énol

La copulation azoïque a eu lieu en *ortho* de l'hydroxy sur les acides 2-naphtol-3,6-disulfonique et 1-naphtol-3,6-disulfonique conduisant respectivement aux colorants **LSP9-3077** et **LSP9-3078**. Ces informations confirment la régiosélectivité décrite dans la littérature à pH basique.^{465, 478-481, 483-486}

La régiosélectivité du composé **LSP9-3077** était prévisible puisqu'une seule position en *ortho* de l'énol est disponible. Les études RMN confirment cette orientation par la présence de signaux caractéristiques de la forme hydrazone. De plus, en RMN ^1H il est possible de noter la présence à 8,42 ppm d'un doublet correspondant au proton H_5 qui corrèle avec le proton H_6 à 7,83 ppm. L'expérience de NOESY, montrant une corrélation H_1 et H_8 , confirme que la substitution s'est réalisée sur le carbone C_3 .

Sur l'acide 1-naphtol-3,6-disulfonique, la copulation azoïque peut se réaliser sur deux positions, à savoir en *ortho* ou en *para* de l'énol. Une seule substitution en *ortho* a été caractérisée à pH basique. La RMN ^1H du composé **LSP9-3078** confirme qu'aucune substitution n'a eu lieu sur les carbones C_5 , C_6 ou C_8 . En effet, il est possible d'observer la présence d'un doublet de doublet à 7,75 ppm correspondant au proton H_6 avec deux constantes de couplage :

- 8,2 Hz qui corrèle en $^3J_{\text{H-H}}$ avec le doublet de H_5 à 8,26 ppm
- 1,6 Hz qui corrèle en $^4J_{\text{H-H}}$ avec le petit doublet de H_8 à 7,87 ppm.

Ainsi, deux positions restent possibles, le carbone C_1 ou le carbone C_3 . Une substitution en C_1 est écartée par la présence de la forme hydrazone et d'une corrélation dans l'espace entre les protons H_1 et H_8 .

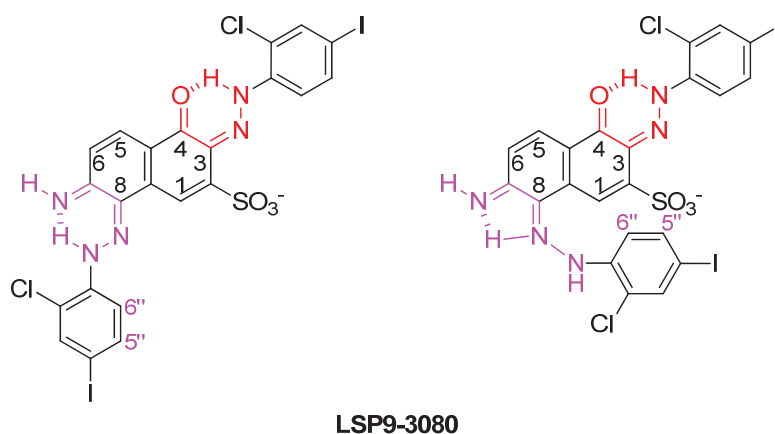
Copulation en ortho de l'énol et de l'aniline

Contre toute attente, l'acide 7-amino-4-hydroxynaphtalènesulfonique a subi deux substitutions électrophiles aromatiques. En effet, le composé **LSP9-3080** présente une masse en de $766,2 \text{ g.mol}^{-1}$ en spectrométrie de masse ESI $^-$.

Les études RMN ont permis de caractériser la structure de ce colorant dicouplé présentant vingt-deux carbones en RMN ^{13}C . De la même manière que pour les colorants monoazoïques précédents, le spectre ^1H témoigne de la présence d'un proton fortement déblindé à 16,36 ppm qui corrèle en $^4J_{\text{H-C}}$ avec la cétone C_4 à 174,64 ppm et en $^3J_{\text{H-C}}$ avec le carbone C_3 . De plus, le proton H_1 corrèle en $^4J_{\text{H-C}}$ avec le carbone C_4 . Cette information permet de lever le doute d'une substitution sur la position C_1 ou la position C_8 . Ces signaux caractéristiques sont en outre les témoins de la présence de la forme hydrazone et d'une orientation de la première SE_{Ar} en *ortho* de l'hydroxy.

En s'intéressant au cycle portant la fonction naphtylamine, la RMN ^1H indique la présence de deux doublets qui ne peuvent correspondre qu'aux protons H_5 et H_6 . Ces signaux témoignent alors d'une orientation de la deuxième SE_{Ar} en *ortho* de l'aniline sur le carbone C_8 . Un proton labile, élargi, à 9,96 ppm

est détecté. Il correspond au proton engagé dans un pseudo-cycle à cinq chaînons avec l'amine aromatique et corrèle avec le carbone C₈ en $^3J_{H-C}$ (Figure VII-22).



En violet : pseudo-cycle à six chaînons ou à cinq chaînons formé avec l'amine aromatique et la liaison diazo
 En rouge : pseudo-cycle à six chaînons formé avec la cétone aromatique et la liaison diazo

Figure VII-22 : Formation de deux pseudo-cycles sur le composé disazoïque LSP9-3080

De plus, l'expérience de NOESY apporte une information intéressante quant à la structure spatiale de ce colorant, puisqu'il existe une corrélation entre proton H₁ et les protons H_{5''}-H_{6''} du substituant. Cette information témoigne de la proximité spatiale de ces atomes et apporte un argument supplémentaire en la faveur d'une régiosélectivité en *ortho* de la naphthylamine sur le carbone C₈ de la deuxième SE_{Ar}.

Aucune information sur une double copulation directe n'est décrite à pH basique dans la littérature. Les analogues du composé **LSP9-3080** sont obtenus après une réaction menée à pH basique pour orienter en *ortho* de l'énol puis à pH acide pour l'orientation en *ortho* de la naphthylamine.⁴⁸⁸ Cependant, les auteurs préfèrent acétyler la fonction amine avant de réaliser une copulation à pH basique.^{487, 489} Même s'ils ne donnent pas d'information sur le choix d'une protection de cette fonction, il semble que ce soit pour se prémunir de copulations annexes.

Copulation azoïque sur acide 7-amino-1,3-naphtalènedisulfonique acide

Dans les conditions permettant l'accès aux trois colorants précédents, aucune copulation ne s'est réalisée sur l'acide 7-amino-1,3-naphtalènedisulfonique acide.

Conclusions

Cette étude de régiosélectivité de l'orientation de la réaction de substitution électrophile aromatique a permis de montrer la nécessité d'une fonction énol pour que la copulation azoïque puisse se réaliser à pH basique. Dans ce cas, la substitution a d'abord lieu en position *ortho* de l'hydroxy. Cependant, la présence

488. Chang, J. B., *et al.* Ibid.**2012**, 92, 737-744.

489. Wojciechowski, K., *et al.* *Dyes Pigments*. **2003**, 56, 99–109.

d'un d'énol et d'une amine sur le cycle naphtylamine change la régiosélectivité et conduit à l'obtention de colorants disazoïques. Les résultats obtenus en présence d'une naphtylamine seule indiquent que cette fonction n'est pas suffisante pour jouer le rôle de donneur d'électrons afin de rendre le cycle naphthalène-sulfonique nucléophile.

➤ Copulation sur l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique

L'étude de la régiosélectivité sur les naphthalène-sulfoniques précédents ont permis d'apporter des informations sur la régiosélectivité de la copulation sur des motifs simples. Nous nous sommes alors proposés d'évaluer cette réaction sur l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique possédant quatre lieux de substitutions possibles.

Copulation à pH basique

L'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique a été copulé avec le sel de diazonium de la 2-chloro-4-idoaniline à pH 9 (**Schéma VII-56**).

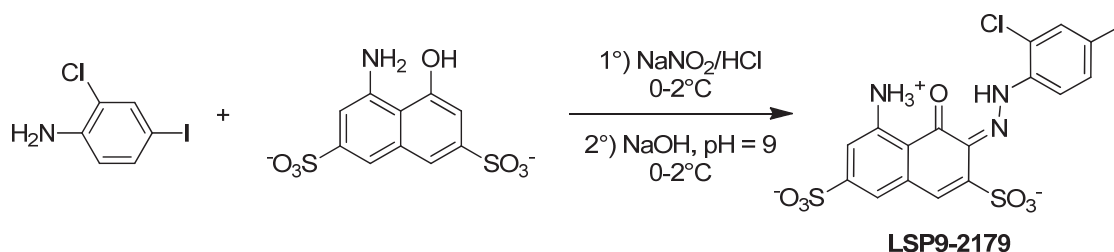


Schéma VII-56 : Synthèse du composé LSP9-2179

Dans ces conditions, la copulation azoïque se réalise en *ortho* de l'énol. Les études RMN confirment cette orientation par la présence d'un signal proton à 15,47 ppm qui corrèle avec un carbone à 181,9 ppm. Ces signaux sont caractéristiques de la forme hydrazone. Un argument en faveur de l'orientation *ortho* est la présence d'une constante de couplage $^3J_{H-H}$ entre les protons H_6 et H_8 . De plus, l'expérience de NOESY, montrant une corrélation H_1 et H_8 , confirme que la substitution a eu lieu sur le carbone C_3 .

Copulation à pH acide

Afin de vérifier l'orientation de la copulation en *ortho* de l'amine, la 2-chloro-4-idoaniline a été diazotée en solution acide en présence de nitrite de sodium. Pour se faire, la réaction de copulation azoïque est réalisée en présence de l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique à pH 4 et conduit au composé **LSP9-3030** (**Schéma VII-57**). La structure de ce composé a été élucidée en confrontant les différentes expériences de RMN 1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HMQC et NOESY.

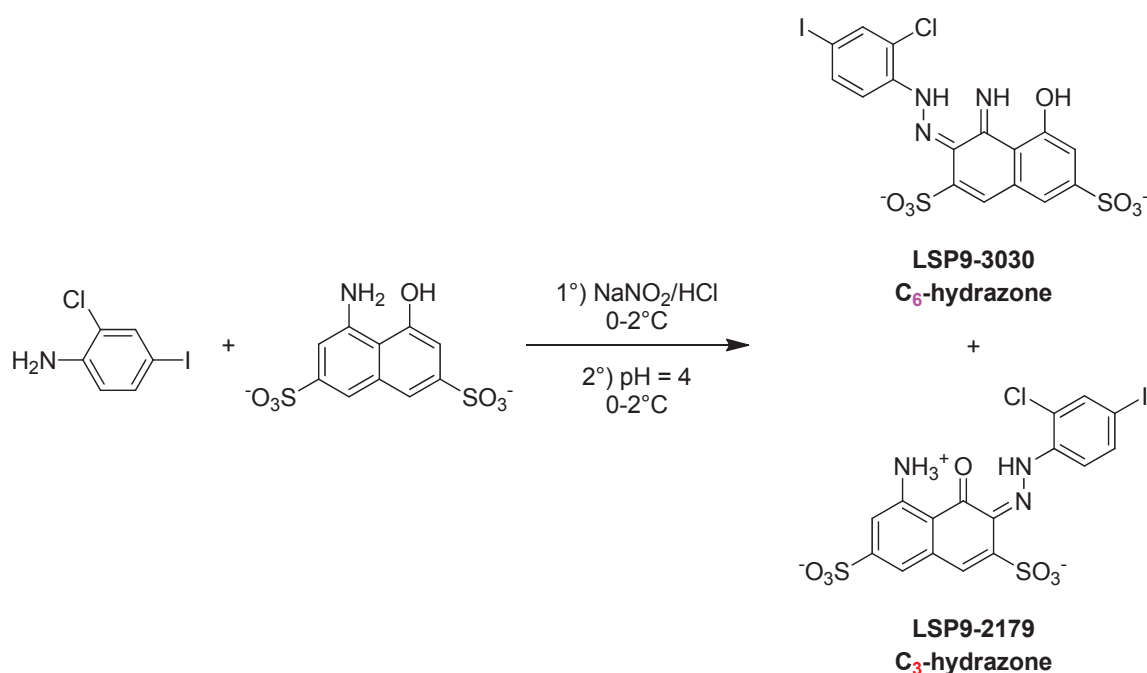


Schéma VII-57 : Voie de synthèse du composé LSP9-3030

La RMN proton du colorant ne présente pas un spectre « classique » d'un colorant ayant subi une SE_{Ar} en *ortho* de l'alcool. Ainsi, le phénol, qui est protonné à ce pH, apparaît sous forme d'un signal élargi à 10,39 ppm. Les signaux singulets des protons du cycle naphthalène-sulfonique ont des déplacements chimiques plus élevés que lors d'un couplage en *ortho* de l'alcool (**LSP9-2179**) puisque les protons H₁, H₃ et H₈ sont respectivement à 7,50, 7,40 et 7,36 ppm. Aucune constante de couplage $^4J_{H-H}$ ne permet de conclure directement sur le lieu de la substitution. Cependant, l'analyse des corrélations longues distances proton-carbone confirme que le proton H₁ corrèle en $^3J_{H-C}$ et $^4J_{H-C}$ respectivement avec les carbones C₃ et C₄. La copulation a donc eu lieu sur le cycle qui porte la fonction naphtylamine.

L'expérience de NOESY a confirmé la présence d'une corrélation spatiale entre le proton H₁ et H₈. Ce composé, **LSP9-3030**, est exclusivement retrouvé sous forme C₆-hydrazone avec un signal large en RMN ^1H à 14,3 ppm.

Cependant, la synthèse réalisée à pH acide ne conduit pas à l'obtention d'un colorant pur puisque la CLHP montre la présence de 8 % d'impureté. Cette dernière a été isolée par CLHP préparative. La caractérisation de cette impureté indique qu'elle correspond à l'homologue de ce colorant couplé en *ortho* de l'alcool.

Ainsi, la réaction de copulation réalisée à pH acide permet l'accès à des colorants possédant une liaison diazo en *ortho* de la fonction naphtylamine et potentiellement en *ortho* de l'hydroxy.

Cette réaction est moins régiosélective, puisque qu'un colorant couplé en *ortho* de l'énol a pu être isolé, cependant aucun couplage en *para* des deux fonctions hydroxyles et naphtylamine ne se réalise. Une explication de cette orientation parasite peut être apportée par un effet dit de « micro-mixing ». En effet, Kaminski *et al.* ont observé que dans certaines conditions de concentration, il pouvait se créer un effet local de variation de pH lors de la réalisation de ces réactions de copulation.⁴⁷² Pour maintenir un pH constant à 4

lors de l'ajout de la solution acide de diazonium, une solution de soude est ajoutée. Il se peut que cette solution basique provoque une augmentation localisée du pH. Sachant que l'énolate est meilleur nucléophile que la naphtylamine, l'augmentation transitoire du pH déprotonnerait la fonction phénol qui réagirait directement sur le diazonium électrophile. Afin d'éviter cette réaction parasite, il est envisageable de réaliser cette réaction de copulation azoïque en solution tamponnée à pH 4.

Effets des anilines possédant un groupement inductif attracteur fort sur la copulation

Nous nous sommes proposés d'évaluer l'influence de substituants inductifs attracteurs portés par le sel de diazonium sur la réaction de copulation azoïque. Pour se faire, l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique a été couplé avec la 2-fluoro-4-iodoaniline et l'acide 2-fluoro-4-aminobenzoïque à pH 9 (**Schéma VII-58**).

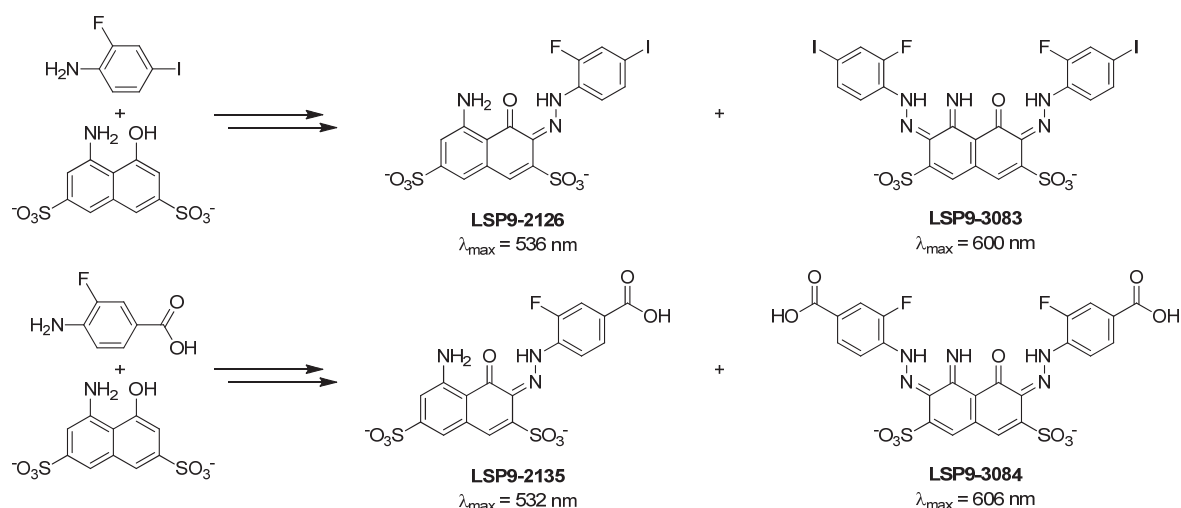


Schéma VII-58 : Réactions de mono- et di- copulation

Dans ces conditions, quatre colorants ont été obtenus après purification par CLHP préparative. Deux de ces composés **LSP9-2126** et **LSP9-2135** ont été caractérisés comme couplés en *ortho* de la fonction énol correspondant à une régiosélectivité classique pour une réaction de copulation à pH 9. Les deux autres colorants, **LSP9-3083** et **LSP9-3084**, présentent deux fonctions hydrazones (C_3 -hydrazone et C_6 -hydrazone) et indiquent la réalisation de deux réactions de SE_{Ar} simultanées.

La caractérisation de la régiosélectivité de la réaction a notamment été possible par différentes expériences RMN réalisées de la même manière que précédemment. Une information importante est apportée par l'expérience de NOESY qui montre une corrélation spatiale entre les protons H_1 et H_8 confirmant que les SE_{Ar} ont eu lieu sur les carbones C_3 et C_6 dans le cas des colorants discouplés.

Ces deux colorants, plus volumineux que leurs équivalents monoazoïques, sont plus retenus en CLHP avec des temps de rétention allongés de 4 à 6 minutes par rapport aux colorants monoazoïques.

Il est possible de constater que ces réactions de discopulation ont été obtenues avec deux anilines portant des substituants fluors connus pour leurs effets inductifs attracteurs. En effet, ces atomes en attirant

à eux les électrons vont appauvrir le cycle aromatique et provoquer une augmentation de l'électrophilie du diazonium. Ainsi, les sels de diazonium seront plus réactifs vis-à-vis d'une attaque nucléophile et en l'occurrence l'attaque induite par le doublet d'électrons de la fonction naphtylamine de l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique. Un corollaire peut alors être fait entre la réactivité de ces sels de diazonium impliqués dans une copulation azoïque et la réactivité de leurs anilines respectives vis-à-vis de la réaction de diazotation. En effet, il a été montré que plus le pKa des anilines, induit par les substituants, est faible plus leur réactivité pour l'ion nitrosonium diminue et inversement.

Ces informations laissent à penser que l'utilisation de sels de diazonium encore plus appauvris conduira à l'obtention exclusive d'un seul composé découplé.

➤ Evaluation de la réactivité du sel de diazonium de l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique

La synthèse des colorants azoïques fait intervenir deux étapes réalisées en *one pot*, dont la première est une réaction de diazotation d'aniline nécessitant un excès de nitrite de sodium. Afin d'évaluer l'influence de l'excès de cet agent diazotant lors de la réaction de copulation azoïque et en s'inspirant des travaux de Naicker *et al.*, l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique a été engagé dans une liaison diazo sur sa fonction naphtylamine.⁴⁹⁰

Pour se faire, le sel de diazonium a été obtenu par l'action du nitrite de sodium en milieu acide chlorhydrique sur l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique (**LSP9-3053**). Ce sel est ensuite couplé avec du crésol à pH 11. Le pH a été sélectionné afin de s'assurer d'être sous forme énolate lors de la réaction à cause du pKa de l' σ -crésol qui est de 10,3 (**Schéma VII-59**).

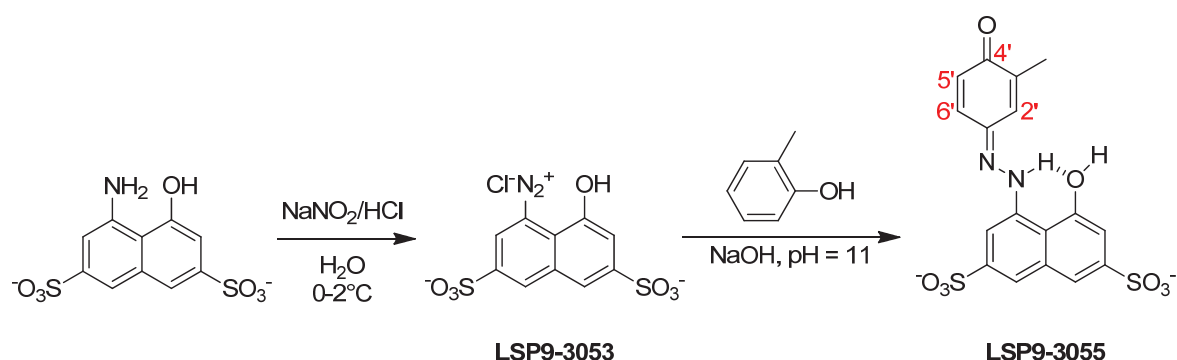


Schéma VII-59 : Voie de synthèse du composé LSP9-3055

Le composé **LSP9-3055** a été obtenu pur après purification par CLHP préparative. La RMN ¹³C révèle la présence d'un carbone à 172,9 ppm correspondant au déplacement chimique du carbone de la cétone C₄. En RMN ¹H, un proton à 13,39 ppm, déblindé, correspond au proton porté par l'azote de l'hydrazone. Là encore, l'oxygène énolique va être impliqué dans une liaison hydrogène avec le proton de l'hydrazone formant ainsi un pseudo-cycle à six chaînons stabilisant la molécule. Le proton alcoolique n'a pu être

490. Naicker, K. P., *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1215-1220.

observé en RMN ^1H mais le déplacement chimique du carbone le portant correspond à un déplacement caractéristique de carbone éolique.

La régiosélectivité de la copulation a pu être validée en para de la fonction phénol par la présence d'un doublet correspondant au proton H_5 qui corrèle en $^3J_{\text{H-C}}$ avec un doublet de doublet correspondant au proton H_6 . Ce doublet de doublet possède une petite constante de couplage due à la corrélation $^4J_{\text{H-C}}$ avec le proton H_2 .

Ainsi, en présence d'un éol substitué en *ortho* par un groupement inductif donneur, la copulation se réalise de façon majoritaire en *para* de l'alcool. Pourtant, l'éol orientant la substitution en *ortho* et en *para*, il est envisageable qu'une substitution en *ortho* de cette fonction ait eu lieu et corresponde aux impuretés purifiées par CLHP préparative. Cependant, la très faible quantité de ces composés recueillis n'a pas permis de pouvoir les caractériser.

➤ Conclusions

Les études d'évaluation de la régiosélectivité de la réaction de copulation azoïque ont permis de montrer que l'orientation de la SE_{Ar} a exclusivement lieu en position *ortho* de l'éol lors de la substitution des acides 2-naphtol-3,6-disulfonique, 1-naphtol-3,6-disulfonique et 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique en milieu alcalin. La présence de cette fonction est d'ailleurs nécessaire pour qu'une réaction de copulation ait lieu sur un motif naphtalène-sulfonique à pH basique. Dans ces conditions, la réaction de copulation ne se réalise pas avec la seule présence de la fonction naphtylamine.

Contre toute attente, l'orientation en *ortho* d'une naphtylamine a même pu être observée en solution alcaline contrairement à ce qui a pu être décrit dans la littérature.^{465, 478-481, 483-486} Au vu de ces résultats de double copulation obtenus avec le composé **LSP9-3080**, il semblerait que la présence d'une fonction naphtylamine change la réactivité des motifs naphtalène-sulfoniques.

Ces informations sont confirmées par l'obtention de deux colorants ayant subi une discopulation en *ortho* de l'éol et en *ortho* de la naphtylamine. Cependant, il a été montré que cette dernière régiosélectivité est imputable à la nature inductif attracteur des substituants portés par le sel de diazonium et donc par leur réactivité.

L'orientation en *ortho* de l'amine de l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique à pH acide, a pu être réalisée et caractérisée via la synthèse du composé **LSP9-3030**. Cependant, cette réaction n'est pas sélective d'une seule orientation.

Il a été démontré que l'excès de nitrite de sodium résultant de la réaction de diazotation peut diazoter l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique (**LSP9-3053**). Son couplage avec du crésol à pH 11 conduit au composé diazoté sur la fonction naphtylamine (**LSP9-3055**).

Ces études des différentes conditions opératoires ont permis d'apporter des précisions sur les orientations des substitutions électrophiles aromatiques en présence de sels d'aryldiazonium. De plus, elles ont permis de mettre en avant qu'à pH basique et en fonction de la nature des substituants, une copulation en *ortho* de l'amine est possible.

Ainsi, les différents essais réalisés ont permis de maîtriser la régiosélectivité de la réaction de copulation diazoïque. Ces informations ont été utilisées pour le développement d'analogues du Bleu Trypan.

VII.2.e Développement et synthèses d'analogues du Bleu Trypan

VII.2.e.i Introduction

Les études réalisées de génération d'aryldiazonium et de régiosélectivité de la copulation diazoïque ont permis de maîtriser les différents paramètres de réaction afin de développer trois familles d'analogues du Bleu Trypan. Une famille de colorant monoazoïque correspondant à une demi-molécule de Bleu Trypan a été développée ainsi que des colorants monoazoïques possédant un motif biaryle dépourvu du motif naphthalène-sulfonique. La troisième famille est constituée d'analogues stricts du Bleu Trypan (**Figure VII-23**). Le développement de ces trois familles a pour objectif d'évaluer leur capacité à inhiber le transport vésiculaire du glutamate ainsi que de déterminer la structure minimale vis-à-vis des VGLUTs.

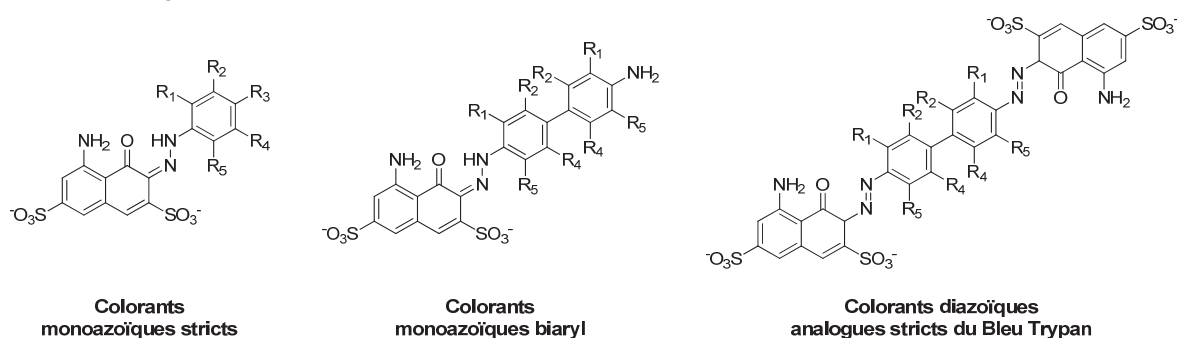


Figure VII-23 : Développement de trois familles d'analogues du Bleu Trypan

VII.2.e.ii Famille des colorants monoazoïques

Les résultats précédemment exposés ont permis de maîtriser l'orientation de la copulation azoïque sur l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique en *ortho* du phénol à pH basique.

Ainsi, deux séries d'anilines et une série de benzamides ont été sélectionnées et diazotées afin d'être copulées avec l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique.

La première série correspond à des colorants portant une fonction acide carboxylique en *para* (R_3) de la fonction diazo. Cette série a été sélectionnée afin de pouvoir réaliser des modifications chimiques ultérieures de ces colorants. Ainsi, la fonction acide carboxylique de ces colorants monoazoïques permet d'envisager la fonctionnalisation du cycle phényle soit avant la réaction de copulation soit après (**Schéma VII-60**). Cette fonctionnalisation par pré-copulation a été évaluée par le développement d'une série de colorants monoazoïques possédant une structure benzamide fonctionnalisée (**Schéma VII-60**).

Une troisième série de colorants azoïques a été développée. Ces molécules présentent un halogène en position R_3 . Exclusivement deux types d'anilines halogénées en *para* de la liaison diazo ont été retenus. A savoir, des anilines iodées et bromées (**Schéma VII-60**). Le choix de ce type de molécules réside là encore, dans un souci de fonctionnalisation. En effet, il est envisageable de pouvoir fonctionnaliser ces colorants par liaison carbone-carbone *via* une réaction de Suzuki-Miyaura.^{455, 456}

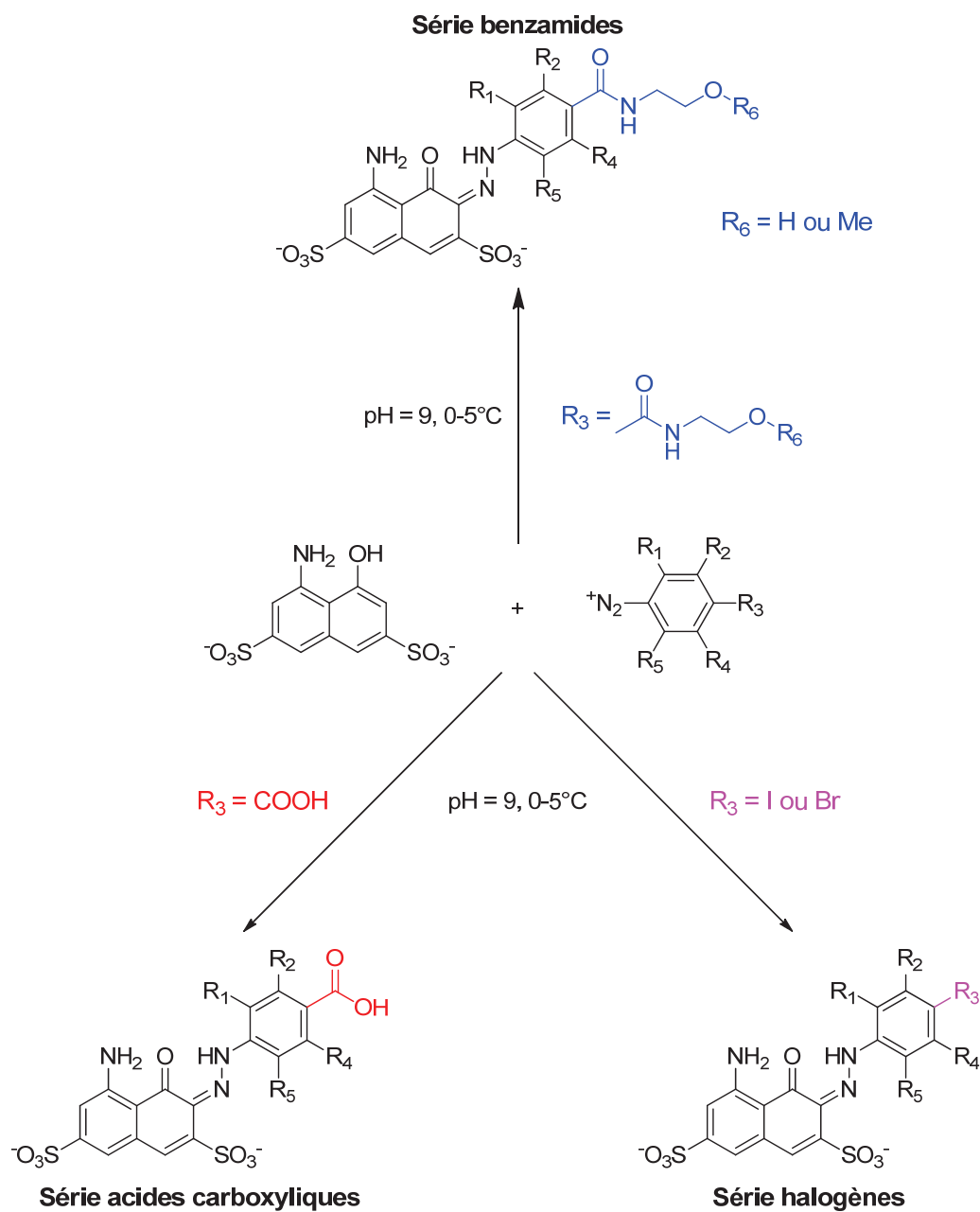
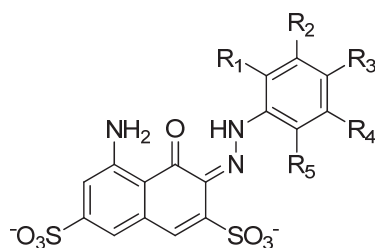


Schéma VII-60 : Développement de trois séries de colorants monoazoïques

➤ Colorants monoazoïques série acides carboxyliques et halogènes

Les résultats des copulations azoïques conduisant aux colorants des séries acides carboxyliques et des séries halogènes sont résumés dans le **Tableau VII-14**.

Tableau VII-14 : Résultats des copulations azoïques série acides carboxyliques et halogénés



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | Rendements | λ_{\max} en nm | CLHP t_R en mn |
|-----------|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| LSP9-2129 | CH ₃ | H | COOH | H | H | 37% ^a | 543 | 8,204 |
| LSP9-2114 | CH ₃ | H | I | H | H | 18% ^a | 543 | 11,782 |
| LSP9-2137 | OCH ₃ | H | COOH | H | H | 85% ^a | 544 | 8,802 |
| LSP9-2122 | OCH ₃ | H | Br | H | H | 20% ^a | 543 | 10,532 |
| LSP9-2139 | CH ₃ | H | COOH | H | CH ₃ | 74% ^a | 530 | 8,341 |
| LSP9-2125 | CH ₃ | H | Br | H | CH ₃ | 24% ^a | 523 | 11,927 |
| LSP9-2177 | H | H | COOH | H | H | 80% ^a | 534 | 5,651 |
| LSP9-2120 | H | H | Br | H | H | 24% ^a | 536 | 10,078 |
| LSP9-2192 | Cl | H | COOH | H | H | 84% ^a | 536 | 8,364 |
| LSP9-2179 | Cl | H | I | H | H | 6% ^a | 527 | 12,120 |
| LSP9-2135 | F | H | COOH | H | H | 12% ^{a,b} | 532 | 8,768 |
| LSP9-2126 | F | H | I | H | H | 3% ^{a,b} | 536 | 10,611 |
| LSP9-3041 | CF ₃ | H | COOH | H | H | 13% ^{a,b} | 529 | 11,805 |
| LSP9-2119 | CF ₃ | H | I | H | H | 2% ^{a,b} | 521 | 12,379 |
| LSP9-3031 | F | F | COOH | F | OH | 52% ^a | 539 | 8,389 |
| LSP9-3032 | F | F | Br | F | OH | 74% ^a | 539 | 12,304 |

^a : Purification par précipitation^b : Purification par CLHP préparative

Ainsi, seize colorants monoazoïques ont été obtenus avec des rendements allant de 2 à 85 %. Ces molécules ont été synthétisées avec les mêmes conditions opératoires de temps, de température et de concentration. Tous ces colorants ont été obtenus par précipitation dans un mélange EtOH/H₂O à pH 2. Cependant quatre d'entre eux, les composés **LSP9-2119**, **LSP9-2126**, **LSP9-2135** et **LSP9-2141**, ont subi une étape supplémentaire de purification par CLHP préparative. Cette purification par CLHP s'explique par le fait que les colorants ont précipité avec des impuretés et ont conduit à l'obtention de ces molécules avec de moins bons rendements.

Au regard des informations fournies par le **Tableau VII-14**, il est possible de constater que les colorants appartenant à la série acides carboxyliques ont été obtenus avec de meilleurs rendements que leurs homologues de la série halogénée. Cette différence peut s'expliquer par une meilleure solubilité des composés possédant une fonction acide carboxylique plus hydrosoluble que les halogènes.

Les analyses de CLHP ont permis de confirmer la meilleure hydrosolubilité des colorants de la série acide carboxylique. En effet ces molécules possèdent un temps de rétention inférieur de deux à trois minutes par rapport aux colorants halogénés. Ainsi, les colorants acides sont élués lorsque le gradient d'élution contient une plus forte quantité d'eau par rapport aux colorants halogénés.

Alors que la présence d'une fonction acide carboxylique ou halogène en position R_3 a une influence sur les rendements et la solubilité des colorants, il semblerait que la nature de ces groupements influence peu leurs longueurs d'onde. Dans la majorité des cas, les homologues acides carboxyliques et halogènes ont des longueurs d'onde identiques ou avec une différence de quelques nanomètres.

➤ Réactivité particulière d'anilines tétrafluorées

Les colorants **LSP9-3031** et **LSP9-3032** ont été respectivement obtenus après diazotation de l'acide 4-amino-2,3,5,6-tétrafluorobenzoïque et de la 4-bromo-2,3,5,6-tétrafluoroaniline puis couplage sur l'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique en milieu alcalin, dans les mêmes conditions que celles qui ont permis d'obtenir les deux séries de colorants précédemment décrites. Cependant, les structures de ces deux colorants, **LSP9-3031** et **LSP9-3032**, ne sont pas celles qui étaient attendues (**Schéma VII-61**).

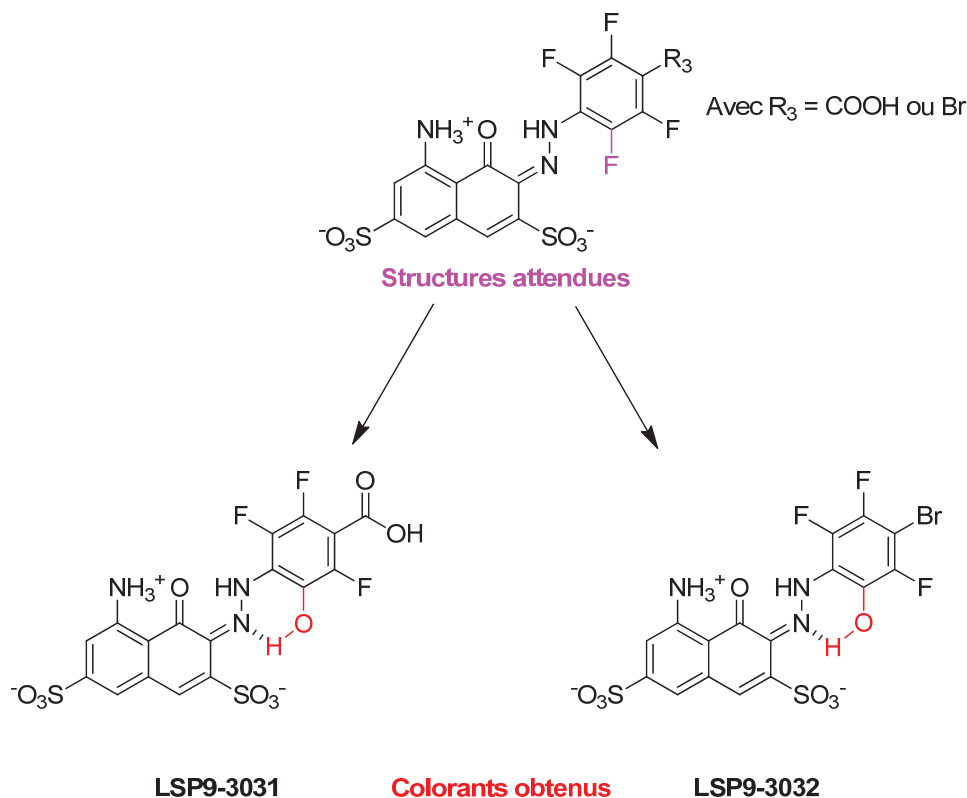


Schéma VII-61 : Structures attendues et obtenues de colorants azoïques fluorés

Les composés **LSP9-3031** et **LSP9-3032** possèdent une fonction hydroxyle en position R₅ (**Schéma VII-61**). Le premier argument, indiquant que les colorants **LSP9-3031** et **LSP9-3032** n'ont pas la structure attendue, est l'analyse de la spectrométrie de masse. Les composés évalués ont une différence de deux unités de masse avec les masses attendues. De plus, les RMN ¹H de ces deux molécules présentent des signaux singulets épatés respectivement dans la zone de 10 ppm, signaux caractéristiques d'une fonction phénol. Afin d'avoir la certitude qu'une substitution nucléophile aromatique (S_N_{Ar}) par des ions OH⁻ a eu lieu en position R₅, ces deux colorants ont été analysés par RMN du Fluor. La RMN ¹⁹F a confirmé la présence de trois atomes de fluor sur ces colorants. De par les déplacements chimiques et la multiplicité de ces signaux, il est possible de confirmer que la S_N_{Ar} a bien lieu en position R₅.

Afin de comprendre cette substitution, la 4-bromo-2,3,5,6-tétrafluoroaniline a été solubilisée dans de l'eau pure puis le pH du milieu a été ajusté à 10. Les analyses spectroscopiques ont permis de montrer qu'aucune substitution aromatique n'a lieu sur ce composé.

Dans la littérature, la substitution nucléophile aromatique par les ions hydroxyde sur un cycle aromatique poly-fluoré a été décrite à température ambiante en *ortho* d'un groupement désactivant, tel que le groupement nitro et en présence d'un agent de transfert de phase, tel que le tétrabutylammonium hydrogénosulfate.^{491, 492} Cependant, pour se faire, il faut que la molécule possède un groupement mésomère attracteur et un agent de transfert de phase pour que les ions OH⁻ puissent passer dans la phase organique où se réalise la réaction. Plus récemment, Tanaka *et al.* ont montré que l'hydroxylation d'un cycle poly-fluoré peut se réaliser avec la coopérativité d'un atome d'azote portant un doublet d'électrons libres en milieu organique.^{493, 494}

Au vu de ces informations, un mécanisme de S_N_{Ar} par les ions hydroxyde a été proposé. Ainsi, le cation sodium établirait une coordination relativement forte soit avec un oxygène du groupement sulfonate soit avec le doublet libre de l'amine de l'hydrazone. Cette coordination aurait pour effet d'accompagner les ions OH⁻ près d'un atome de fluor en *ortho* de la liaison diazo. Ce cycle étant appauvri en électrons par les effets inductifs attracteurs des halogènes et/ou de la fonction acide carboxylique, les hydroxydes attaquent le cycle aromatique et substituent un atome de fluor (**Schéma VII-61**).

Les structures ainsi obtenues sont des composés qui sont stabilisés par la formation de deux liaisons hydrogènes induisant deux pseudo-cycles à six chaînons (**Schéma VII-61**).

➤ Série des colorants monoazoïques dérivés de benzamide

Une autre série de colorants monoazoïques dérivés de benzamide a été synthétisée de façon similaire aux colorants précédents. Les résultats des copulations azoïques conduisant aux colorants de la série benzamide sont résumés dans le **Tableau VII-15**.

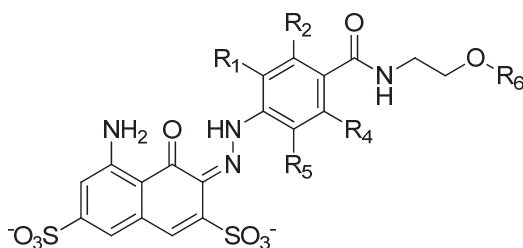
491. Landini, D., *et al.* *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 2264-2268.

492. Marriott, J. H., *et al.* *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **2000**, 4265-4278.

493. Tanaka, K., *et al.* *J. Fluorine Chem.* **2006**, 127, 1073-1078.

494. Tanaka, K., *et al.* *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, 44, 303-307.

Tableau VII-15 : Résultats des copulations azoïques série des benzamides



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₄ | R ₅ | R ₆ | Rendements Bruts | % NaCl |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|------------------|--------|
| LSP9-2066 | OMe | H | H | H | H | 71 % | 40 % |
| LSP9-2067 | OMe | H | H | H | CH ₃ | 78 % | 35 % |
| LSP9-2058 | CH ₃ | H | H | H | H | 28 % | 75 % |
| LSP9-2064 | CH ₃ | H | H | H | CH ₃ | 29 % | 45 % |
| LSP9-2068 | H | H | H | H | H | 29 % | 50 % |
| LSP9-2081 | H | H | H | H | CH ₃ | 37 % | 20 % |
| LSP9-2057 | Cl | H | H | H | H | 84 % | 65 % |
| LSP9-2051 | Cl | H | H | H | CH ₃ | 85 % | 25 % |
| LSP9-2063 | F | H | H | H | H | 25 % | 90 % |
| LSP9-2053 | F | H | H | H | CH ₃ | 59 % | 90 % |
| LSP9-2054 | F | F | F | F | H | 19 % | 60 % |
| LSP9-2056 | F | F | F | F | CH ₃ | 31 % | 85 % |

Chacun des dérivés de benzamides synthétisés ont été engagés dans une réaction de copulation azoïque à pH 9 après diazotation.

Une méthode de précipitation à chaud et dans l'éthanol a été utilisée. Cette méthode s'est révélée intéressante quant à la purification des composés mais pose un problème majeur de concentration en sels. En effet, la méthodologie de synthèse par diazotation à l'acide chlorhydrique, puis l'étape de copulation à pH basique avec de la soude, introduit dans le milieu réactionnel une quantité importante de chlorure de sodium. La méthode de précipitation utilisée pour ces colorants n'est pas adaptée, puisqu'elle a conduit à concentrer les sels de NaCl. Ainsi les rendements de ces réactions de diazotation sont faussés par une proportion de sels qui a été évaluée par analyse élémentaire et spectroscopie UV-visible. Des essais de dessalage de ces colorants ont été réalisés mais conduisent difficilement à l'obtention de molécules dessalées. Les différentes méthodes de purification employées seront discutées dans le **Paragraphe VII.3**.

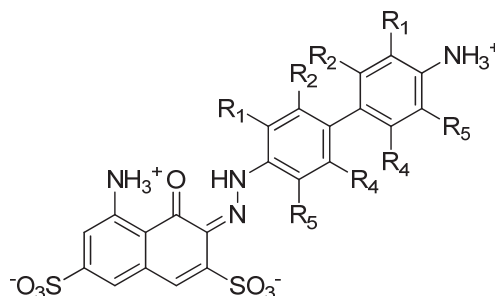
➤ Série des colorants monoazoïques biaryles

Les différentes études, de monoprotection ou de monodiazotation de dérivés de benzidine ont permis l'accès à des colorants n'ayant qu'une seule fonction azoïque.

Ainsi les différents analogues de benzidine ont été copulés dans les conditions classiques de couplage azoïque à pH 9.

Les résultats des SE_{Ar} réalisées sont résumés dans le **Tableau VII-16**.

Tableau VII-16 : Résultats des copulations azoïques série de colorants monoazoïques biaryles



| Référence | R1 | R2 | R4 | R5 | λ_{max} en nm | Rendements | CLHP t_R en mn |
|---------------------------------|-----------------|----|----|----|--------------------------|------------|---------------------|
| LSP9-2187 ^a | CH ₃ | H | H | H | 545 | 25 % | 9,946 |
| LSP9-2142 ^a | H | H | H | H | 537 | 40 % | 8,436 |
| LSP9-3075 ^a | Cl | H | H | H | 551 | 42 % | 13,372 |
| LSP9-3070 ^{a,b} | CF ₃ | H | H | H | NC | 2 % | 11,042 |
| LSP9-3073 ^{a,b} | F | H | H | H | NC | 6 % | 10,634 |
| LSP9-3071 ^{a,b} | F | F | F | F | NC | 2 % | 11,709 |

^a : Purification par précipitation

^b : Purification CLHP préparative

NC : non communiqué

L'interprétation des rendements de réaction est rendu difficile par le fait que trois composés ont été purifiés par CLHP préparative. Cependant, il est possible de remarquer que les colorants, n'ayant été obtenus purs qu'après précipitation, sont ceux possédant des groupements inductifs attracteurs. Ces informations confortent l'hypothèse que la nature des substituants portés par les sels de diazonium influence la réaction de copulation azoïque. Ainsi, il est envisageable que les produits secondaires purifiés par CLHP soient des colorants couplés en *ortho* des fonctions naphthylamine et hydroxyle. Ces structures ne peuvent être confirmées à cause de la très faible quantité recueillie empêchant d'effectuer des études de caractérisation.

De façon non surprenante, les temps de rétention de ces composés sont allongés par rapport à leurs homologues des séries acides carboxyliques et halogénées.

Au regard des valeurs obtenues pour les longueurs d'onde, il semblerait que la présence d'un cycle aromatique supplémentaire par rapport aux colorants monoazoïques n'ait que peu d'influence sur le λ_{max} . Pourtant, un cycle aromatique branché en position R₃ devrait augmenter la délocalisation des électrons et ainsi faire varier les longueurs d'onde. En comparant les composés, portant un groupement méthyle en position R₃ dans les trois séries de colorants monoazoïques, il est possible d'observer un gain de 2 nanomètres en faveur du colorant biaryle **LSP9-2187**. Le constat est identique pour les molécules étant substituées par des hydrogènes. Par contre, il y a une augmentation de 15 à 24 nanomètres en faveur du composé **LSP9-3075** substitué en R₃ par un atome de chlore. Ces différentes observations, quant à la

variation de la longueur d'onde et de surcroît de la couleur de ces molécules, est imputable à la fonction azoïque ainsi qu'à la nature des substituants situés à proximité.

VII.2.e.iii Famille des colorants diazoïques, les analogues stricts du Bleu Trypan

➤ Introduction

Le Bleu Trypan est la molécule chimique qui possède à l'heure actuelle, la meilleure capacité inhibitrice compétitive des transporteurs vésiculaires du glutamate. De la même manière que des analogues monoazoïques ont été développés, des analogues structuraux du Bleu Trypan ont été synthétisés (**Schéma VII-62**).

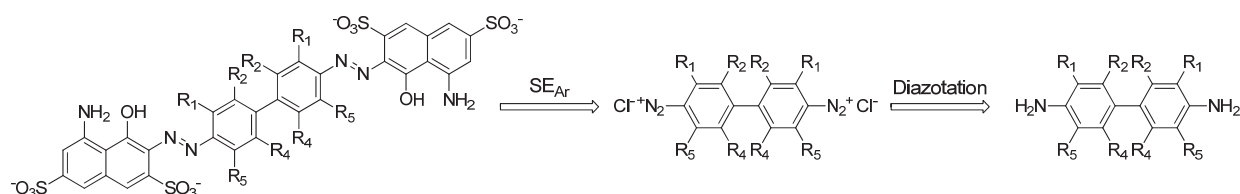


Schéma VII-62 : Schéma rétrosynthétique d'accès aux colorants de type Bleu Trypan

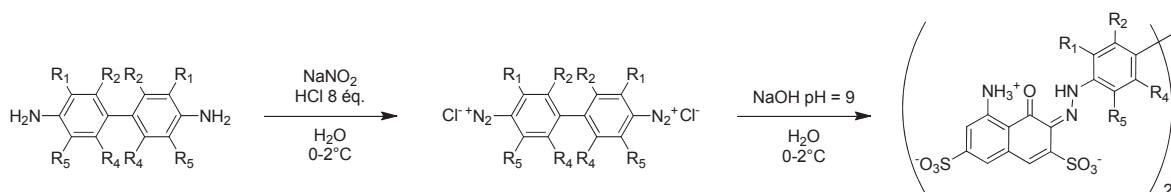
➤ Synthèse d'analogues stricts du Bleu Trypan

Afin d'avoir accès à différents analogues de Bleu Trypan, huit dérivés de benzidine symétriques ont été sélectionnés. Ces molécules ont été choisies afin de pouvoir comparer l'activité des différents colorants monoazoïques avec celle des dérivés du Bleu Trypan.

Les études préliminaires de diazotation de dérivés de benzidine ont permis d'appréhender la synthèse de leurs sels de diazonium. Ces composés électrophiles sont ensuite engagés dans une réaction de copulation diazoïque en milieu basique afin de contrôler la régiosélectivité en *ortho* de la fonction éinol.

Les résultats de la réaction de copulation diazoïque sont résumés dans le **Tableau VII-17**.

Tableau VII-17 : Résultats des copulations diazoïques



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₄ | R ₅ | Rendements |
|---------------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|------------|
| LSP9-3079 ^a | H | H | H | H | 96 % |
| LSP9-2097 ^{a,b} | CH ₃ | H | H | H | 3 % |
| LSP9-2107 ^{a,b} | O-Me | H | H | H | 6 % |
| LSP9-2106 ^{a,b} | CH ₃ | H | H | CH ₃ | 8 % |
| LSP9-2103 ^{a,b} | Cl | H | H | H | < 5% |
| LSP9-2105 ^{a,b} | F | H | H | H | < 5% |
| LSP9-1148 ^{a,b} | F | F | F | F | 1 % |
| LSP9-3076 ^{a,b} | CF ₃ | H | H | H | 1 % |

^a : Purification par précipitation^b : Purification CLHP préparative

Sur les huit colorants obtenus, seul le composé **LSP9-3079** a été obtenu pur après précipitation avec un très bon rendement de 96 % (**Figure VII-24**). Les sept autres analogues du Bleu Trypan ont nécessité une purification par CLHP préparative. Ce travail d'accès aux analogues du Bleu Trypan requiert un long travail de purification. La purification de ces colorants sera discutée dans le **Paragraphe VII.3**.

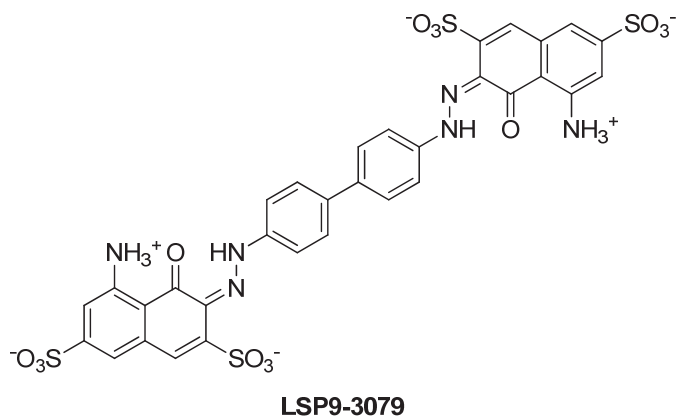


Figure VII-24 : Structure du colorant LSP9-3079

Les études de caractérisation RMN ont permis de démontrer que le composé **LSP9-3079**, tout comme ses homologues monoazoïques, les composés **LSP9-2120** et **LSP9-2173**, sont sous forme C₃-hydrazone.

Au regard des résultats obtenus, il apparaît que la synthèse de composés diazoïques est moins régiosélective à pH basique que celle permettant l'accès aux colorants ne possédant qu'une seule fonction

azo. En effet, de nombreux sous-produits ont dû être éliminés par CLHP afin d'accéder aux dérivés du Bleu Trypan. Cette différence de réactivité entre les analogues du BT et les colorants monoazoïques réside certainement dans le fait qu'une deuxième substitution électrophile aromatique doit se réaliser. Vraisemblablement, une fois la première copulation réalisée, la fonction hydrazone qui possède un effet mésomère donneur peut mobiliser son doublet d'électrons π pour rentrer en résonnance avec le cycle biaryle. Cette délocalisation a pour principal effet de stabiliser le diazonium le rendant alors moins électrophile et donc moins réactif vis-à-vis de la SE_{Ar} .

VII.2.e.iv Conclusions

Le développement de colorants azoïques a permis l'accès à 42 colorants possédant différents substituants. Ces composés répartis en trois familles vont permettre de pouvoir apporter de nouvelles informations quant à l'inhibition des transporteurs vésiculaires du glutamate et notamment d'évaluer la structure minimale requise pour une inhibition efficace. Cependant, lors du développement de ces colorants de nombreux problèmes de purification et de caractérisation ont été rencontrés et font l'objet du **Paragraphe VII.3**.

VII.3 Purification et caractérisation des colorants

VII.3.a Introduction

La purification et l'analyse des colorants se sont révélées être une étape particulièrement délicate pour les dérivés de Rose Bengale et les analogues azoïques de Bleu Trypan.

Beaucoup d'informations concernant la purification et la caractérisation de ces composés ont été trouvées dans une littérature spécialisée principalement dédiée à l'Industrie. En effet, de nombreux colorants et pigments sont utilisés dans la coloration des textiles, des papiers, de certains plastiques et la fabrication d'encres. Dans ces différentes industries, la problématique de purification est différente de la nôtre. Principalement, le choix d'optimisation de la production est plus axé sur un critère de rendement au détriment de la pureté de ces colorants. Notre démarche est inverse puisque la pureté des composés prévaut sur les rendements de synthèse.

Ces difficultés sont intrinsèques à leurs structures comme leur hydrosolubilité, leur caractère polaire et leur capacité à former des agrégats. En effet, les colorants de type Rose Bengale ou Bleu Trypan possèdent des structures hautement aromatiques et planes. Cette particularité structurale leur confère la capacité de s'agréger *via* des interactions hydrophobes entre les cycles aromatiques provoquant un effet de π -stacking.^{495, 496} Cette agrégation explique pourquoi ces colorants sont peu solubles dans la majorité des

495. Bilski, P., *et al.* *J. Photochem. Photobiol. A.* **1997**, 110, 67-74.

496. Abbott, L. C., *et al.* *J. Phys. Chem. B.* **2004**, 108, 13726–13735.

497. Coan, K. E. D., *et al.* *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9606-9612.

solvants organiques.⁴⁹⁷ De ce fait, la majorité des méthodes classiques de purification utilisées en synthèse organique sont peu efficaces.

Ce paragraphe a pour objectif de mettre en exergue les problématiques rencontrées et les solutions apportées lors de la purification et de la caractérisation des colorants synthétisés.

VII.3.b Purification des colorants

VII.3.b.i Purification des dérivés de Rose Bengale

La faible solubilité des colorants de type Rose Bengale en solvant organique est un inconvénient majeur pour l'étape de purification puisque les méthodes classiques de chromatographie par silice sont inexploitable. Cependant, cet inconvénient s'est révélé être un atout puisque leur faible solubilité a été mise à profit afin de les faire précipiter. Ainsi tous les analogues de fluorescéine et de Rose Bengale ont été obtenus purs après extraction et précipitation.

VII.3.b.ii Purification des colorants azoïques

Comme cela a été longuement décrit, l'accès aux colorants azoïques se réalise en deux étapes.

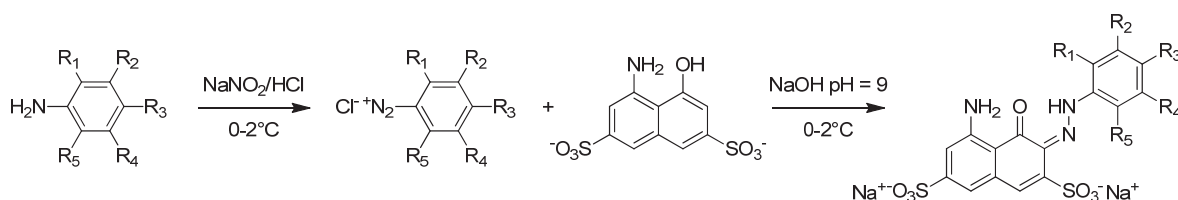


Schéma VII-63 : Voie de synthèse des colorants azoïques

La première étape, conduisant au sel de diazonium, est réalisée en milieu acide par de l'acide chlorhydrique qui a pour effet d'augmenter la concentration d'ions chlorures dans le milieu réactionnel (**Schéma VII-63**). La copulation azoïque est réalisée à pH basique par ajout de soude. Ainsi il y a formation de chlorure de sodium dans le milieu réactionnel. Il s'est avéré que cette concentration en sels pose de nombreux problèmes notamment de concentration en colorants dans les échantillons obtenus.

Afin de développer une méthode de purification efficace les différents sous-produits et leur nature ont été identifiés. En fin de synthèse, la purification doit permettre de s'absoudre des éventuels composés organiques provenant de la dégradation des sels de diazonium, de l'excès de NaCl, du naphthalène-sulfonique n'ayant pas réagi, et doit permettre de séparer les différents colorants synthétisés.

Dans cette optique, différentes purifications ont été évaluées et confirmées par spectroscopie.

VII.3.b.iii Dessalage des analogues de Bleu Trypan

Le fait qu'il y ait une concentration, importante de sels dans certains échantillons, est venue d'un simple constat : tous les colorants synthétisés ne possèdent pas la même intensité de couleur. Ainsi, ces colorants ont été évalués par analyse élémentaire et UV-visible et les valeurs ont été comparées à celles du Bleu Trypan commercial. Ce colorant diazoïque a alors été sélectionné comme étalon afin de pouvoir évaluer les méthodes de dessalage utilisées. Le Bleu Trypan possède une densité optique (DO) de 1.84 (à 10^{-4} M) pour son maximum d'absorption à 580 nm à la concentration de 10^{-4} M. Le pourcentage de carbone mesuré est de 46,93 % en analyse élémentaire.

Dans la littérature plusieurs méthodes de dessalage ont été décrites. Cependant, certaines méthodes sont des procédés industriels utilisés pour dessaler de grande quantité de colorants qui nécessite une adaptation pour une utilisation à l'échelle du gramme. Afin de pouvoir évaluer la meilleure méthode de dessalage, le composé **LSP-2097** (Bleu Trypan) a été synthétisé puis le milieu réactionnel a été divisé en plusieurs fractions. Ces fractions identiques ont subi des traitements de dessalage parallèles :

- dessalage par la DMF,
- dessalage sur Séphadex G25,
- dessalage sur colonne de silice,
- dessalage sur plaque préparative,
- dessalage par précipitation à chaud,
- dessalage butanol-eau
- dessalage par précipitation.

➤ Dessalage au diméthylformamide (DMF)

Les premiers tests de dessalage ont été effectués en solubilisant le colorant dans de la diméthylformamide (DMF), solvant connu pour sa faible capacité de solubilisation de sel.

Le colorant ainsi obtenu possède une DO de 0,94 à 10^{-4} M et un pourcentage de carbone mesuré à 20,53 % (**Figure VII-25**).

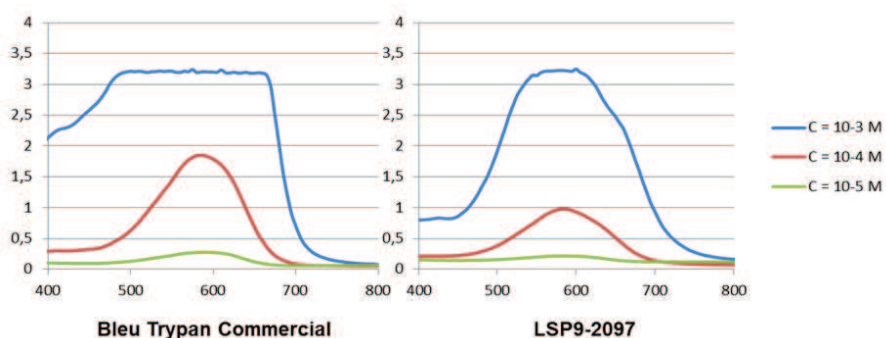


Figure VII-25 : Comparaison des spectres UV du Bleu Trypan commercial et du composé LSP9-2097

Cette méthode est peu efficace pour dessaler les colorants et n'a donc pas été retenue.

➤ Dessalage par Sephadex G25

La résine d'exclusion Sephadex G25 fine est une résine connue pour sa capacité à dessaler des molécules.⁴⁹⁸ Les pores de la résine mesurent entre 20 et 80 μm , ainsi les sels rentrent dans ces pores et cheminent plus doucement que les molécules, de poids moléculaire supérieur, qui sont éluées plus rapidement.

Le colorant **LSP9-2097** dessalé de cette manière possède en analyse élémentaire une proportion de carbone de 25,28% contre les 46,93 % attendus et une densité optique de 1,08 (à 10^{-4} M) bien inférieure au 1,84 du Bleu Trypan commercial.

Les résultats obtenus par dessalage sur Sephadex sont légèrement meilleurs que ceux obtenus par solubilisation dans la DMF mais ils restent peu satisfaisants.

➤ Dessalage sur colonne de silice

L'éluant utilisé est un mélange BuOH/Prop-2-ol/AcOEt/H₂O en proportion 2/4/3/1. Ce mélange de solvant a été décrit par Freeman *et al.* lors de purification de colorants par colonne.⁴⁹⁹ Le colorant **LSP9-2097** dessalé sur colonne de silice possède en analyse élémentaire une quantité de carbone de 27,14 % contre les 46,93 %. Il reste alors près de 40 % de NaCl. De plus, les colorants ont tendance à rester accrochés à la silice, rendant cette méthode peu efficace.

➤ Dessalage sur plaque préparative

Le colorant est purifié, sur plaque préparative de 2 mm, élué par un mélange de solvant BuOH/EtOH/pyridine/NH₄OH. Ce mélange est d'ailleurs utilisé en chromatographie sur couche mince (CCM) pour suivre l'évolution de la réaction de copulation azoïque.^{500, 501}

Cette méthode est moins efficace que le dessalage sur colonne de silice puisque la proportion de carbone du composé recueilli est de 23,79 % et la DO est de 1,04 à 10^{-4} M.

➤ Dessalage par précipitation à chaud

Le colorant est précipité à chaud dans l'éthanol. Puis le colorant obtenu est lavé par de l'éthanol. Cette méthode conduit au résultat inverse à ce qu'il pouvait être envisagé. A savoir que les colorants obtenus de cette manière ont des proportions de NaCl très importante allant de 20 à 90 % de la masse recueillie. Il apparaît alors que l'éthanol chaud solubilise mieux le NaCl que les colorants azoïques.

498. Porath, J., *et al.* *Nature*. **1959**, 183, 1657-9.

499. Freeman, H. S., *et al.* *Dyes Pigments*. **1986**, 7, 397–405.

500. Bae, J. S., *et al.* *Dyes Pigments*. **2003**, 57, 121–129.

501. Patel, D. R., *et al.* *Dyes Pigments*. **2011**, 90, 1–10.

502. Freeman, H. S., *et al.* *Dyes Pigments*. **1986**, 7, 407–417.

➤ Dessalage par extraction butanol-eau

En s'inspirant de la littérature et d'une méthode de chromatographie liquide par contre-courant, ces colorants ont été dessalés par extraction butanol-eau.⁵⁰² Les colorants azoïques présentant une bonne solubilité dans ce solvant alcoolique comparé au chlorure de sodium. Ainsi, des échantillons de colorant possédant 4 % de carbone ont pu être obtenus après ce dessalage avec une proportion de carbone de 35 %

➤ Dessalage par précipitation à froid

Le colorant est précipité à plusieurs reprises à froid dans un mélange EtOH-H₂O en proportion 1-1 à pH 2. Le colorant précipité est recueilli avec un pourcentage de carbone de 46,89 % comparable aux 46,93 % du produit commercial. Le spectre UV-visible de ce colorant est strictement identique à celui du Bleu Trypan de référence.⁴⁶⁵

Le dessalage par extraction-butanol eau est une alternative intéressante aux méthodes décrites précédemment. Cependant, il n'en reste pas moins que la méthode, qui s'est révélée être la plus efficace sur le dessalage des colorants azoïques, est la méthode par précipitation à froid. Ainsi, la majorité des colorants synthétisés a été obtenue de cette manière. Cependant, cette méthode a révélé ses limites en terme de purification lors de l'obtention de mélange de colorants mono, dis et diazoïques.

VII.3.b.iv Purification par chromatographie liquide haute performance (CLHP)

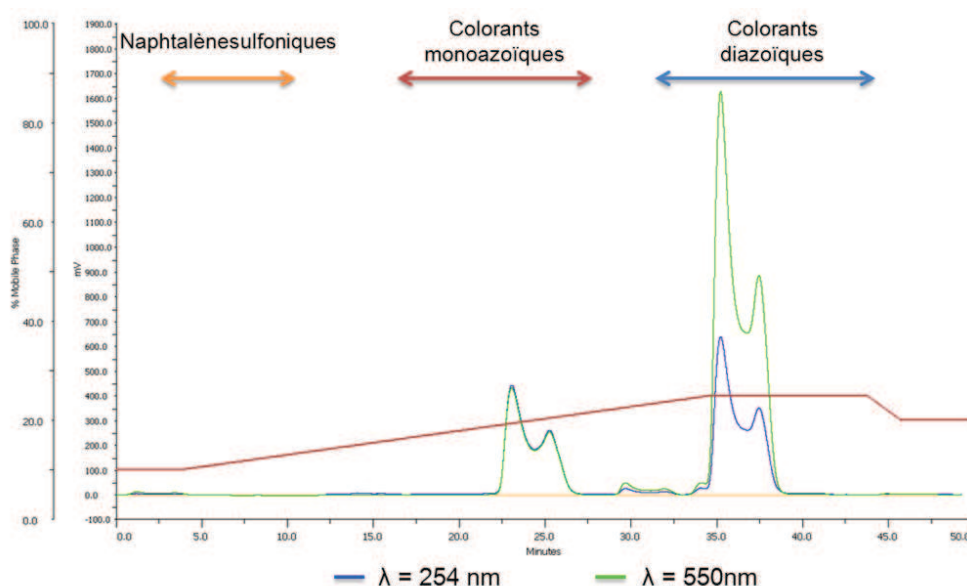


Figure VII-26 : Chromatogramme de CLHP préparative du composé LSP9-2135 et zones de prédominance des espèces

La CLHP préparative s'est révélée être une méthode de purification de choix des colorants azoïques. Elle permet notamment de pouvoir séparer les colorants monoazoïques des colorants dicouplés et de s'absoudre d'éventuels excès d'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique ou de sous-produits. En fonction du lieu de la substitution, les molécules présentent des temps de rétention différents permettant une séparation aisée lors d'une élution par un tampon acétate d'ammonium à 0,05 M (**Figure VII-26**). La détection des composés est réalisée à 254 nm, permettant de caractériser des molécules aromatiques non couplées tel qu'un excès d'acide 5-amino-4-hydroxynaphtalène-2,7-disulfonique et à 550 nm, de détecter les différents colorants azoïques même présents en très faible quantité.

VII.3.b.v Conclusions

Une des problématiques de la synthèse de colorants de type Rose Bengale ou analogues de Bleu Trypan réside dans l'étape de purification. Cependant, leur relative faible solubilité dans certains solvants a permis de les purifier par précipitation et de s'absoudre d'impuretés. Cette méthode s'est révélée être la plus efficace en ce qui concerne le dessalage de composés azoïques. De plus, une méthode de recristallisation couplée à la CLHP préparative a permis de séparer et de purifier les différents régioisomères des colorants azoïques. De la même manière que la purification de ces molécules a apporté plusieurs problématiques, la caractérisation de ces composés a nécessité le développement d'une stratégie d'identification des colorants.

VII.3.c Caractérisation des colorants azoïques

Comme l'étape de purification, la caractérisation des colorants est délicate. Ces difficultés sont intrinsèques à la nature de ses composés. La présence de sels a causé de nombreux problèmes de caractérisation empêchant l'obtention de spectres RMN et d'analyse par spectrométrie de masse avant dessalage. Ainsi, la purification de ces composés doit être menée jusqu'à son terme avant de pouvoir obtenir des informations structurales.

VII.3.c.i Caractérisation des dérivés de Rose Bengale

La spectroscopie RMN ^1H ne s'est pas révélée être une méthode de caractérisation efficace des analogues du Rose Bengale à cause de la structure même de ces molécules. En effet, le Rose Bengale ne possède que deux protons symétriques (**Figure VII-27**). Le seul signal alors attendu est un singulet. De plus, l'introduction d'iodes ou de bromes sur les dérivés de fluorescéine, confère à ces deux protons restant un haut degré d'anisotropie. Ces protons relaxant assez mal, les spectres ^1H qui ont pu être obtenus présentent des signaux larges. Des essais de changement de température ont été menés ainsi que de dilution des échantillons mais sans succès sur la qualité des spectres.

Il en est de même en RMN ^{13}C . Les carbones sont fortement désactivés, tout d'abord à cause de l'aromaticité de la molécule, mais aussi à cause de la présence d'halogènes qui accentue ce phénomène de désactivation. Dépendant de ces phénomènes, un seul spectre RMN ^{13}C a pu être obtenu, pour le Rose

Bengale (**LSP9-1019**), après plusieurs jours d'acquisition. Ce temps d'expérience long empêche alors une utilisation de cette méthode en routine.

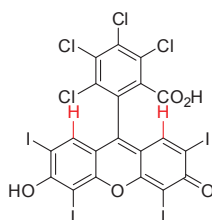


Figure VII-27 : Les deux protons symétriques du Rose Bengal (**LSP9-1019**)

De ce fait, une stratégie de caractérisation séquentielle a été développée (**Schéma VII-64**). Les dérivés de fluorescéine obtenus après polycondensation sont identifiés par confrontation des informations fournies par la RMN, la spectrométrie de masse et l'analyse CLHP. Les dérivés de fluorescéine ont des structures possédant plus de protons que leur homologues iodés rendant possible l'analyse par RMN ^1H . Ces motifs ont pu être aussi caractérisés par RMN ^{13}C . En effet, les carbones de ces composés sont moins désactivés que ceux des analogues de Rose Bengal présentant des halogènes sur le cycle xanthène.

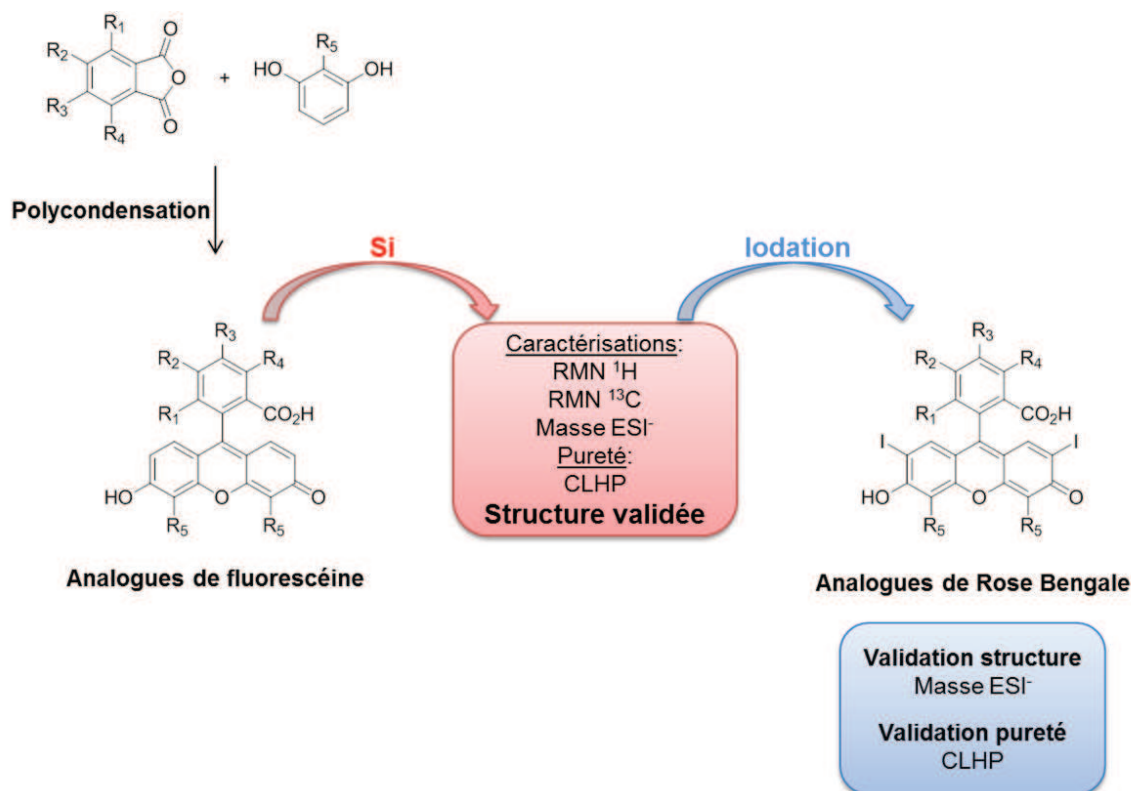


Schéma VII-64 : Stratégie de caractérisation des analogues du Rose Bengal

L'analyse par spectrométrie de masse permet d'observer des pics uniques correspondant à la masse de $[M-H]^-$, dans de rares cas le pic positif $[M+H]^+$ a pu être vu en mode ESI⁺. La pureté de ces molécules est évaluée par chromatographie liquide haute performance.

Si les analogues de fluorescéine satisfont ces 3 critères de caractérisation et le critère de pureté, ils sont engagés dans l'étape d'iodation conduisant à des analogues du Rose Bengale. Les structures des intermédiaires étant caractérisées, l'identification des composés obtenus après iodation est réalisée par spectrométrie de masse et la pureté est évaluée en CLHP.

Cette stratégie a donc permis de faciliter la caractérisation des analogues du Rose Bengale.

VII.3.c.ii Caractérisation des analogues du Bleu Trypan

La caractérisation des analogues de colorants azoïques est intimement liée aux voies de purification utilisées (**Schéma VII-65**).

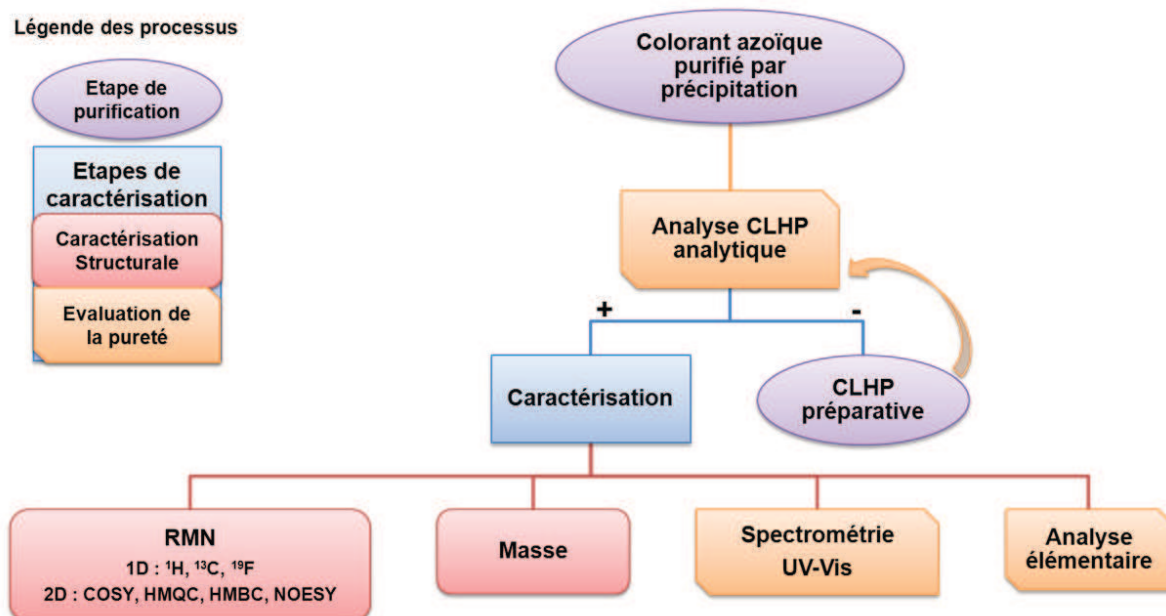


Schéma VII-65 : Voie de purification et de caractérisation des colorants azoïques

Chaque colorant obtenu par précipitation est évalué par CLHP analytique. En fonction de sa pureté il est, soit analysé directement, soit il nécessite une purification supplémentaire par CLHP préparative.

Tous les colorants révélés comme étant purs par CLHP sont ensuite caractérisés par spectroscopie RMN, spectrométrie de Masse, UV-visible et analyse élémentaire.

➤ Spectroscopie RMN : exemple d'un analogue du Bleu Trypan

La spectrométrie RMN est une méthode d'analyse structurale qui a donné de nombreuses informations telles que l'orientation de la copulation azoïque et nombre de liaisons azo. Le DMSO-d₆ est un solvant

polaire connu pour sa capacité de forte solubilisation. De plus, il permet de pouvoir caractériser les protons échangeables.

Afin de mieux appréhender les nombreuses informations fournies par les différentes expériences RMN, l'analyse du composé **LSP9-3031** est proposée comme analyse type de la structure des colorants azoïques (**Figure VII-28**).

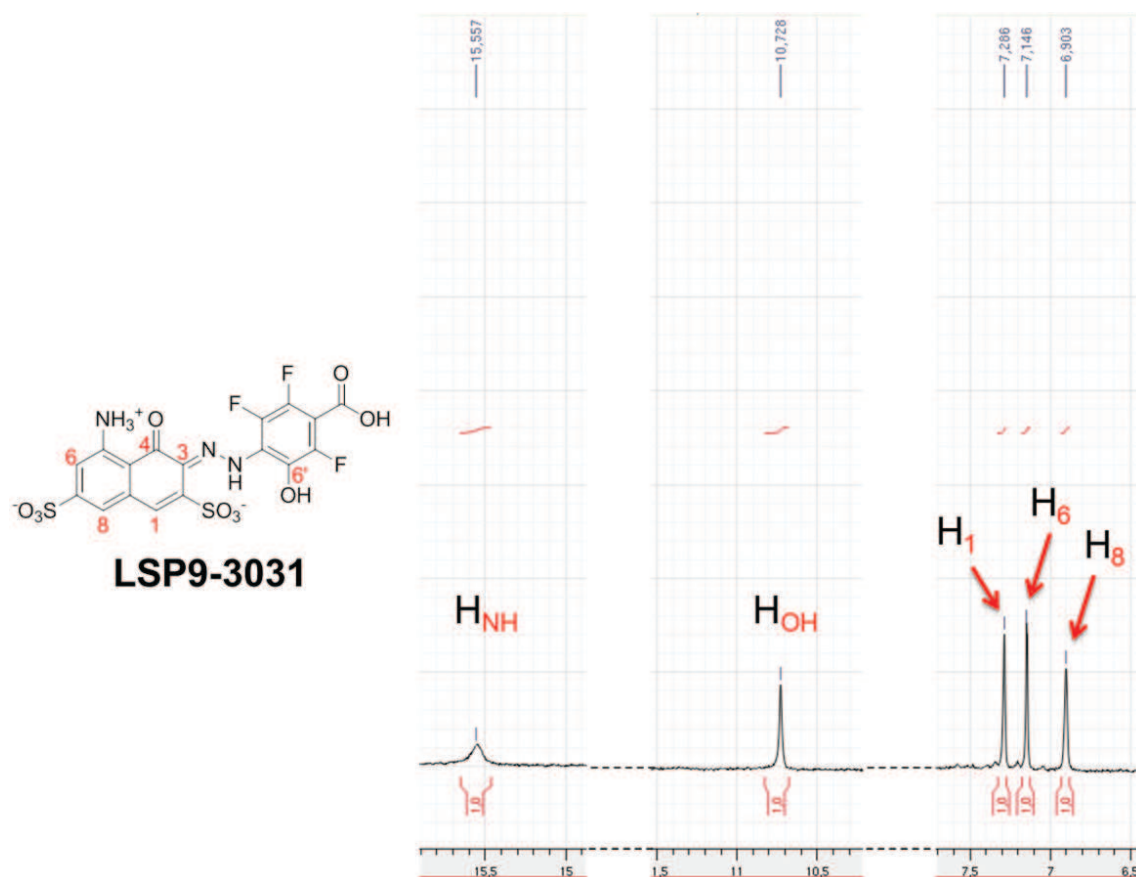


Figure VII-28 : Spectre RMN ¹H du composé LSP9-3031

Le spectre RMN ¹H est composé de 5 signaux intégrant chacun pour un proton (**Figure VII-28**). Deux protons sont fortement déblindés à 15,56 et 10,73 ppm et trois sont situés dans la zone des protons aromatiques. Ces trois protons vont permettre de déterminer le lieu de la copulation azoïque en étudiant leurs corrélations avec les carbones. La RMN ¹³C présente un signal caractéristique très déblindé à 182.5 ppm correspondant à une cétone aromatique et en l'occurrence au carbone C₄. Un signal proton à 7,29 ppm corréle à longue distance en HMBC avec le carbone C₄ permettant de conclure sur le fait que ce déplacement chimique correspond soit au proton H₁ soit au proton H₈. Cette ambiguïté est levée par la présence d'une corrélation proton-proton dans l'espace, *via* une expérience de NOESY, entre le proton à 7,29 ppm et un proton à 6,90 ppm. D'un point de vue structural, les seuls protons pouvant corrélés entre eux dans l'espace sont les protons H₁ et H₈. Ainsi, le déplacement à 7,29 ppm correspond à H₁ et le déplacement à 6,90 à H₈. Le dernier proton aromatique non attribué est le proton H₆ qui possède un déplacement chimique de 7,15 ppm. Ces informations de l'étude des déplacements des atomes du noyau naphthalène-

sulfonique permettent d'indiquer que la copulation azoïque a eu lieu sur le carbone C₃, c'est-à-dire en *ortho* de la fonction émol.

Le proton fortement déblindé à 15.56 ppm correspond à un proton échangeable puisqu'il disparaît lors de l'ajout de D₂O. Ainsi, ce proton peut être un hydrogène porté par un azote ou par un oxygène. De plus, il corrèle à longue distance avec le carbone C₄ portant la cétone aromatique et des carbones dédoublés subissant les couplages dus aux atomes de fluor. Ces informations indiquent alors que la liaison formée entre les deux cycles aromatiques lors de la copulation est sous forme hydrazone et non azo.

Le déplacement à 10,73 ppm correspond à la fonction phénol portée sur le carbone C₆. Cette information est apportée par la corrélation en $^3J_{H-C}$ et $^4J_{H-C}$ entre ce proton et des carbones découplés portant un fluor.

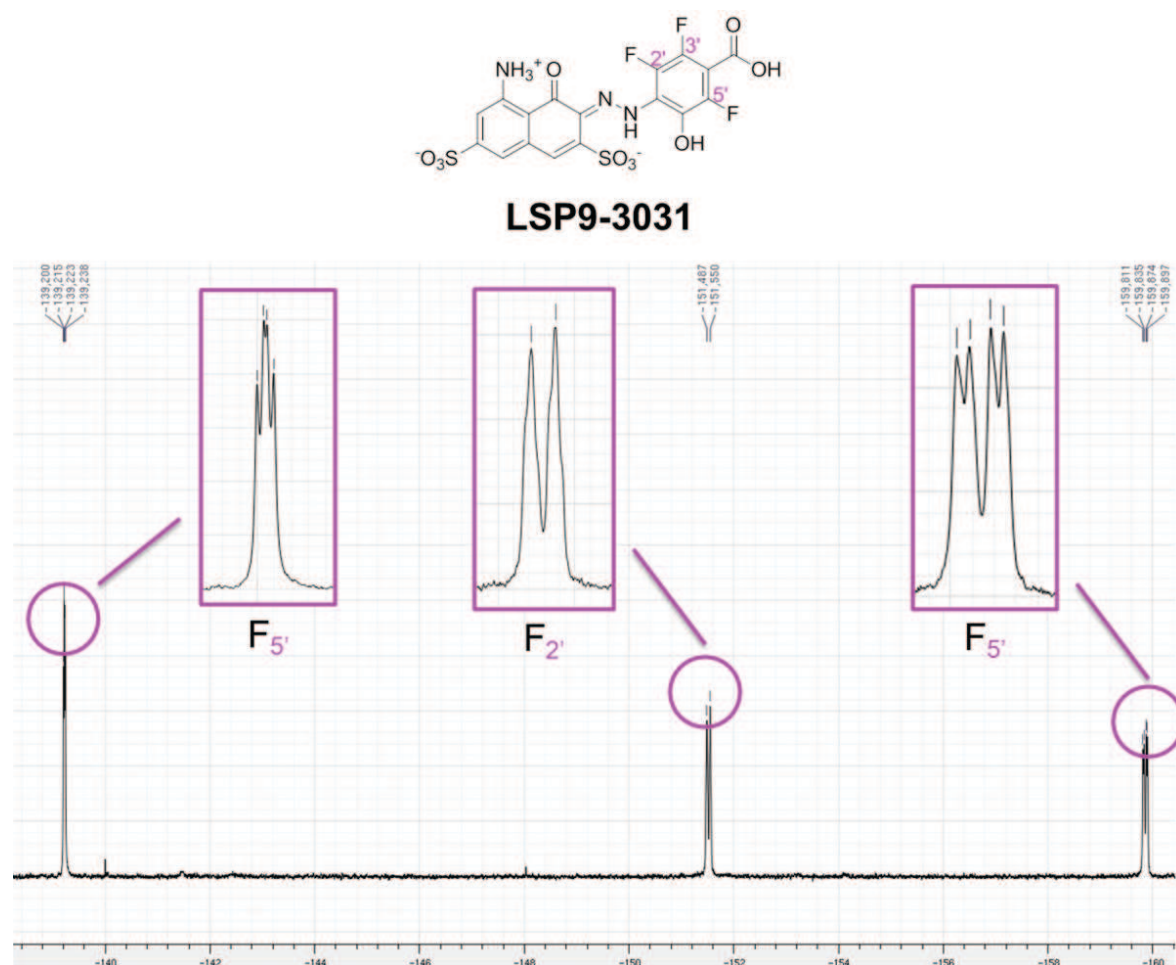


Figure VII-29 : Spectre RMN ^{19}F du composé LSP9-3031

Le spectre fluor présente trois déplacements chimiques chacun sous forme de doublet de doublet confirmant que l'énol est porté par le même cycle que celui qui porte les fluors. L'ensemble des atomes de carbones ont été attribué en continuant l'étude des corrélations proton-carbone à courte distance ($^1J_{H-C}$) et à longue distance ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$), informations fournies respectivement par les expériences d'HMBC et d'HMBC (Figure VII-29).

Cette méthode spectroscopique fournit des informations importantes sur la structure des colorants azoïques, mais elle n'est pas triviale en raison du peu d'information apporté par la RMN ^1H . De plus, que ce soit les expériences à deux dimensions ou de carbone ^{13}C , elles nécessitent un temps d'acquisition très long. A titre d'exemple, la corrélation en $^4J_{\text{H-C}}$ entre le proton porté par l'hydrazone et le carbone C_4 n'est visible qu'après plus de 24 heures d'acquisition en HMBC sur un spectromètre 500 MHz. Un temps identique est nécessaire pour visualiser la corrélation proton-proton en NOESY entre les protons H_1 et H_8 . Il faut au moins 16 heures d'acquisition pour obtenir le spectre carbone. Ainsi, un total de plus de 48 heures d'expériences est requis par colorants pour obtenir les différentes informations spectrales nécessaires à l'analyse de la structure de ces composés.

➤ Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a permis d'observer des pics uniques correspondant à la masse de $[\text{M-H}]^-$, dans de rares cas, un pic à m/z a pu être observé. Cette méthode est précieuse pour confirmer la structure des composés. Elle a notamment permis de donner des pistes quant à la structure des composés **LSP9-3031** et **LSP9-3032** qui présentent une masse inférieure de 2 unités à celles attendues.

➤ Evaluation de la pureté des colorants azoïques

Tout au long de ce travail de développement d'analogues du Bleu Trypan, la CLHP analytique a été indispensable au regard des informations qu'elle pouvait apporter. Informations témoignant de la pureté des composés (**Figure VII-30**).

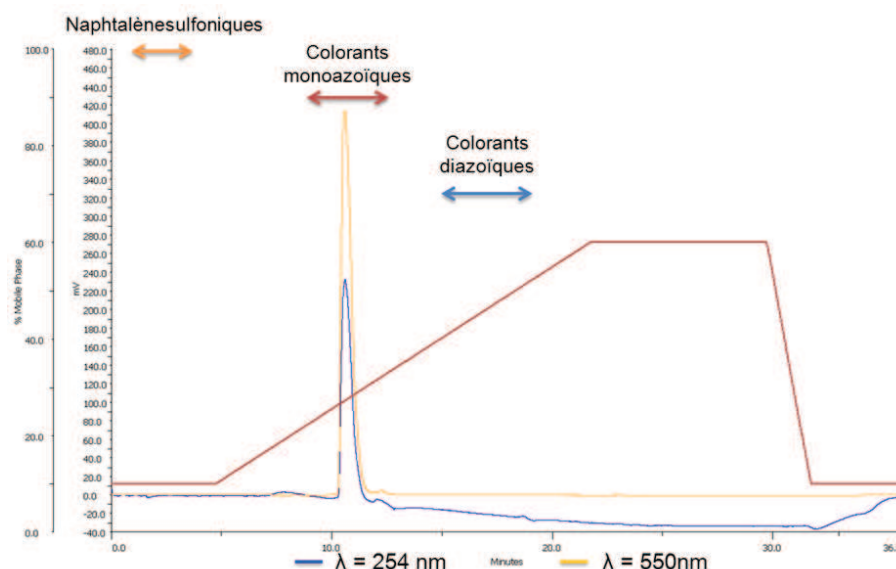


Figure VII-30 : Spectre HPLC analytique et zones d'élution des colorants azoïques

Comme cela a été mentionné dans la section purification (**Paragraphe VII.3.b.iii**), la spectroscopie UV et les analyses élémentaires ont apporté des informations sur la pureté des colorants synthétisés principalement au regard de la concentration en NaCl de ces molécules.

VII.4 Conclusions

Le développement d'analogues du Rose Bengale et du Bleu Trypan s'est révélé être un travail moins aisé qu'il n'y paraît. De nombreux problèmes de synthèse, de purification et de caractérisation ont pu être mis en exergue.

Le développement d'analogues du Rose Bengale a permis l'accès à une série de 18 nouveaux dérivés du Rose Bengale et 14 analogues de fluorescéine. La synthèse de ces composés a permis d'apporter plusieurs précisions quant à la réactivité des dérivés de fluorescéine. Ainsi, l'accès à ces molécules se réalise selon un mécanisme de polycondensation faisant intervenir un intermédiaire acyclique. Cet intermédiaire isolé a permis le développement de dérivés de fluorescéine asymétriques. L'accès à ces molécules permet alors d'envisager de nouvelles fonctionnalisations du motif xanthène telle que l'introduction de groupements volumineux afin d'appréhender l'effet de l'encombrement stérique de ce motif sur l'activité d'inhibition du transport vésiculaire. La synthèse d'analogues de Rose Bengale, à partir de dérivés de fluorescéine, se réalise par iodation. Ainsi, une série d'analogues du Rose Bengale a été synthétisée et ce travail a permis de montrer que l'iodation du motif xanthène se réalise de façon régiosélective sur les quatre positions en *ortho* des fonctions énols et cétones. La fluorescéine et par extension les analogues de Rose Bengale peuvent exister sous deux formes tautomériques lactone ou acide carboxylique. La synthèse de composés mimant ces deux formes a été réalisée et a permis de caractériser la forme ouverte comme étant la seule espèce existante à pH 7,4.

Afin de mener à bien le développement d'analogues du Bleu Trypan, les synthèses d'anilines et de benzidines ont été réalisées. Ainsi, les réactions pallado-catalysées ont permis l'accès à des benzidines symétriques et asymétriques. Afin d'évaluer les différents paramètres de la synthèse d'analogues du Bleu Trypan, une étude de chaque étape de la voie de synthèse a été menée. Ce travail a permis de caractériser les paramètres de diazotation sur différentes anilines. D'ailleurs, cette étude a permis de montrer l'influence des substituants portés par ces molécules sur la réaction de formation de sels de diazonium. Mais les substituants des anilines n'influencent pas seulement la réaction de diazotation, puisque l'étude de régiosélectivité de copulation azoïque a montré que certains substituants désactivants impliquent la formation de colorants disazoïques. Cette étude a permis de confirmer que sur plusieurs motifs naphthalène-sulfoniques, la formation de liaisons azo se réalise en *ortho* de la fonction hydroxyle à pH basique. Le contrôle de cette réaction a permis le développement de 28 colorants monoazoïques, 6 colorants monoazoïques biaryles et 8 analogues stricts du Bleu Trypan. Le développement de ces derniers a révélé que la réactivité des benzidines possédant deux fonctions diazonium est différente des anilines ou des benzidines n'en possédant qu'une seule. En effet, seul un composé a pu être obtenu sans purification supplémentaire par CLHP préparative. Ces informations indiquent que les substituants portés par les benzidines et la présence de deux fonctions diazonium influencent fortement la réaction de SE_{Ar} . Les analogues structuraux du Bleu Trypan synthétisés sont des composés possédant un motif central biaryle symétrique. Ainsi, le développement d'analogues asymétriques de ces colorants serait un nouvel axe de synthèse d'analogues. Ce type de molécules pourrait permettre d'utiliser les effets, inductifs ou mésomères, des substituants sur la réaction de copulation pour orienter la copulation azoïque afin de réaliser de nouveaux colorants avec une plus grande diversité de synthons.

La purification de la majorité de ces colorants a été réalisée par précipitation conduisant à l'obtention de produits purs et dessalés. Cependant, cette étape de purification a parfois été couplée à une purification par CLHP préparative. Grâce à elle, différents régioisomères ont pu être séparés et caractérisés.

La caractérisation de ces molécules n'est pas aisée et ces difficultés proviennent de la nature même des colorants. Ainsi, différents processus d'évaluation structurale ont été mis en place permettant une caractérisation des différents colorants synthétisés.

*VIII. Evaluation de l'activité
biologique des colorants*

VIII. Evaluation de l'activité biologique des colorants

VIII.1 Introduction

Le glutamate est connu comme étant le principal neurotransmetteur excitateur au niveau du système nerveux central. Un dérèglement de la neurotransmission médiée par le glutamate est impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et de surcroît, dans la mémoire et l'apprentissage. Au niveau de l'élément présynaptique, le glutamate est incorporé dans des vésicules de stockage *via* les transporteurs vésiculaires du glutamate.

Le travail de synthèse, précédemment décrit, a permis l'accès à de nouveaux composés. Afin d'évaluer leur capacité d'inhibition du transport vésiculaire du glutamate, un test de mesure du glutamate tritié sur vésicules entières a été sélectionné et adapté de la littérature.^{186, 355, 503, 504}

D'après Takamori *et al.*⁵⁰⁵

Figure VIII-1 : Modèle moléculaire d'une vésicule synaptique

-
- 503. Huttner, W. B., *et al. J. Cell Biol.* **1983**, 96, 1374-1388.
 - 504. Kish, P. E., *et al. Methods Enzymol.* **1989**, 174, 9-25.
 - 505. Takamori, S., *et al. Cell.* **2006**, 127, 831-846.

Ces vésicules sont hautement fonctionnalisées et possèdent différentes protéines de surface, de transports et de signalisations nécessaires à leur fonctionnement. De plus, ces vésicules de transport ne sont pas forcément spécifiques d'un seul transport. Takamori et *al.* ont décrit que différents transporteurs de neurotransmetteurs sont présents à la surface des vésicules tels que VGLUT1-3, VACHT et VMAT2. Le gradient de protons, nécessaire au fonctionnement du transport vésiculaire, est assuré par une V-ATPase localisé sur la membrane des vésicules (**Figure VIII-1**).^{116, 505} Ces observations témoignent de la complexité de ce matériel biologique et du fait que les inhibiteurs de transporteurs peuvent agir sur différentes cibles présentes sur les vésicules synaptiques.

Le test de mesure de recapture du glutamate nécessite un travail de préparation du matériel biologique en amont. Il faut, pour cela, purifier les vésicules synaptiques à partir du striatum, du cortex cérébral, de l'hippocampe et du tronc cérébral de rats *Sprague-Dawley*.

Ces vésicules pures sont ensuite mises en présence des composés à évaluer, puis la quantité de glutamate tritié recapturé dans les vésicules synaptiques est mesurée par comptage de la radioactivité.

VIII.2 Evaluation de la capacité inhibitrice des analogues de Rose Bengale

VIII.2.a Pharmacologie des transporteurs vésiculaires du glutamate

Afin de rationaliser la synthèse des nouveaux dérivés du Rose Bengale, les études de relation structure-activité réalisées en 2005 par Bole et Ueda ont été utilisées.³⁵⁵ Ces auteurs, lors de leur étude, ont décrit qu'il existait une différence d'activité entre les molécules sous forme quinonique ou sous forme lactone. Cependant, comme cela a été décrit précédemment, à pH physiologique les dérivés Rose Bengale n'existent généralement que sous forme anionique. Ainsi, il paraissait intéressant de continuer cette étude en tenant compte de la forme prédominante des composés. Pour se faire, une nouvelle étude de relation structure-activité des dérivés du Rose Bengale sur les VGLUTs a été réalisée.

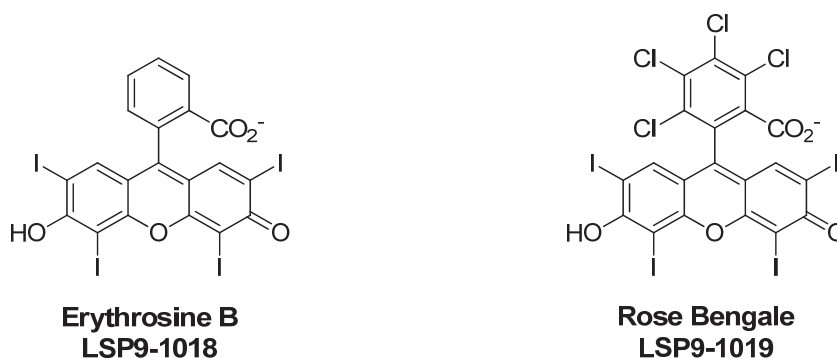


Figure VIII-2 : Structures de l'Erythrosine B et du Rose Bengale

Jusqu'alors, les tests classiques de recapture de [^3H]-glutamate étaient réalisés en système 12 puits. Cependant, ce type de mesure est peu adapté à l'évaluation d'une chimiothèque et une étude de relation structure-activité à cause du nombre limité de composés pouvant être testés simultanément. Ainsi, nous nous sommes proposés de développer et de valider un test d'évaluation des modulateurs de l'activité du transport vésiculaire sur plaque 96 puits.

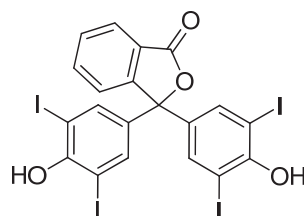
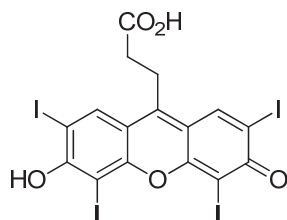
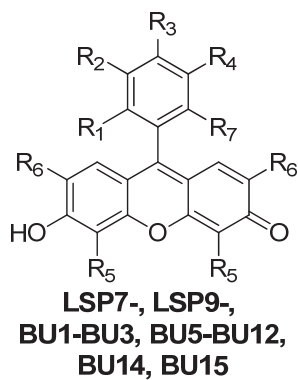
La validation du test a été possible par comparaison des valeurs des CI_{50} obtenues dans les deux tests pour l'Erythrosine B (**LSP9-1018**) et le Rose Bengale (**LSP9-1019**) (**Figure VIII-2**).

Les CI_{50} sont pour l'Erythrosine B de 36 nM en plaque 96 puits comparées aux 35 nM obtenus dans les conditions classiques. Pour le Rose Bengale, les valeurs sont de 25 nM en plaque contre 22 nM obtenus par Bole et Ueda³⁵⁵. Ainsi le test mis en place s'est révélé être conforme. De plus, l'évaluation des composés en plaque 96 puits présente certains avantages, notamment la robustesse du test et une précision augmentée. Ces avantages sont à corrélés avec le nombre de composés testés sur la même plaque.

Les analogues de Rose Bengale ont tendance à s'agréger à des concentrations micromolaires. Cette caractéristique pose un problème majeur pour l'évaluation des composés dans cette zone de concentration. Dans le but de palier à ce problème, les molécules ont été solubilisées dans le tampon de transport, filtrées et leurs concentrations précises déterminées par CLHP.

Les activités des composés sont reportées dans le **Tableau VIII-1** ainsi que celles évaluées par Bole et Ueda, répertoriées sous l'appellation **BU1-BU15**. Ces activités sont à comparer aux valeurs obtenues pour le Rose Bengale ($\text{CI}_{50} = 25$ nM) et l'Erythrosine B ($\text{CI}_{50} = 36$ nM), composés ayant permis de calibrer le test.

Tableau VIII-1 : Activités des nouveaux composés (LSP7- ; LSP9-) et des composés évalués par Bole et al.³⁵⁵ (BU1-15)



| Composé | R1 | R2 | R3 | R4 | R5 | R6 | R7 | CI ₅₀ nM (n) |
|------------------------|----|----|----|----|----|----|--------------------|----------------------------|
| LSP9-1019 | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | CO ₂ H | 25 ± 3,2 (9) |
| LSP7-1069 | Cl | H | H | Cl | I | I | CO ₂ H | 27 ± 4,1 (3) |
| LSP9-1018 | H | H | H | H | I | I | CO ₂ H | 36 ± 6,5 (6) |
| LSP7-1074 | H | Cl | Cl | H | I | I | CO ₂ H | 41 ± 8,4 (3) |
| BU1 | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | CO ₂ Me | 44 |
| BU6 | Cl | Cl | Cl | Cl | Br | Br | CO ₂ H | 51 |
| BU2 | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | CO ₂ Bn | 65 |
| BU9 | H | H | H | H | Br | Br | CO ₂ Et | 65 |
| BU14 | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | H | 68 |
| LSP9-1025 | Br | Br | Br | Br | I | I | CO ₂ H | 74 ± 11,7 (9) |
| LSP7-1066 | F | F | F | F | I | I | CO ₂ H | 102 ± 5,4 (3) |
| BU10 | H | H | H | H | Br | Br | CO ₂ Me | 117 |
| LSP9-1031 ^a | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | CO ₂ H | 123 ± 17,4 (4) |
| LSP9-1037 | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | CO ₂ Et | 192 ± 5 (4) |

| | | | | | | | | |
|--------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|----------------------|-----------------|------------------|--|--------------------|
| LSP9-1138 | H | H | H | H | Br | NO ₂ | CO ₂ Et | 238 ± 9 (2) |
| LSP7-1055 ^b | H H | CO ₂ H H | H CO ₂ H | H H | I I | I I | CO ₂ H CO ₂ H | 288 ± 71 (3) |
| BU7 | H | H | H | H | Br | Br | CO ₂ H | 406 |
| LSP7-1050 | H | H | H | H | CH ₃ | I | CO ₂ H | 531 ± 175 (3) |
| BU3 | H | NCS- | H | H | I | I | CO ₂ H | 689 |
| LSP7-1070 ^b | H H | CH ₃ H | H CH ₃ | H H | I I | I I | CO ₂ H CO ₂ H | 987 ± 137 (3) |
| BU5 | H | H | H | H | I | H | CO ₂ H | 1060 |
| BU4 | - | - | - | - | I | I | CO ₂ H | 2200 |
| BU8 ^c | H | H | H | H | Br | NO ₂ | CO ₂ H | 2445 |
| BU13 ^c | H | H | H | H | I | I | CO ₂ H | 3850 |
| LSP7-1068 ^b | H H | tBu H | H tBu | H H | I I | I I | CO ₂ H CO ₂ H | 5925 ± 3685 (2) |
| LSP7-1047 | NO ₂ H | H H | H H | H NO ₂ | I I | I I | CO ₂ H CO ₂ H | 6690 ± 2048 (2) |
| LSP7-1077 | OH | H | H | H | I | I | CO ₂ H | 7800 ± 648 (2) |
| LSP9-1038 ^{c,d} | Cl | Cl | Cl | Cl | I | I | CO ₂ H | 8824 ± 1119 (2) |
| BU11 | Cl | Cl | Cl | Cl | H | H | CO ₂ H | 15000 |
| BU15 | H | H | H | H | OH | H | SO ₃ H | >32000 |
| BU12 | H | H | H | H | H | Cl | CO ₂ H | >64000 |
| LSP9-1014 | H | H | H | H | H | H | CO ₂ H | Inactif (3) |
| LSP9-1022 | Cl | Cl | Cl | Cl | H | Mono- naphtyl | CO ₂ H | Inactif (3) |
| LSP9-1032 | Cl | Cl | Cl | Cl | H | Di-naphtyl | CO ₂ H | Inactif (3) |

^a RB monoéther, ^b Mélange de deux diastéréoisomères, ^c Forme lactone, ^d RB diéther

VIII.2.b Etude de relation structure-activité

La capacité à inhiber les VGLUTs des dix-sept dérivés du Rose Bengale, développés au laboratoire, a permis de compléter l'étude de relation structure-activité réalisée par Bole et Ueda.³⁵⁵

Sur ces dix-sept nouveaux composés, aucun ne s'est révélé avoir une meilleure activité que le Rose Bengale (**LSP9-1019**) à savoir 25 nM.

VIII.2.b.i Détermination de la forme bioactive

Le composé **LSP9-1031** correspond au Rose Bengale monoéther et il possède une Cl_{50} de 123 nM. Le composé **LSP9-1038** qui possède deux groupements éthers méthyliques et, bloqué sous forme lactone, a une activité de 8824 nM. La différence d'activité entre le Rose Bengale (**LSP9-1019**) et le composé monoéther (**LSP9-1031**) est d'une centaine de nanomolaires. Cette faible différence indique que l'éthérification d'une seule fonction hydroxyle n'affecte que légèrement l'activité. Cependant, l'éthérification des deux fonctions hydroxyles, qui contraint la molécule sous une forme lactone, conduit à une perte importante d'activité. En effet le composé monoéther (**LSP9-1031**) subit toujours l'équilibre tautomérique lactone-quinone (**Schéma VII-17**), et sachant que cet équilibre est déplacé vers la quinone à pH physiologique, il semblerait que la lactone ait un effet délétère sur l'activité.

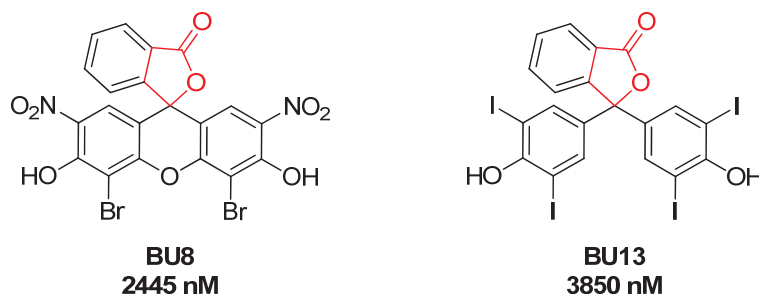


Figure VIII-3 : Structures et activités des lactones BU8 et BU13

Le composé **LSP9-1138**, c'est-à-dire l'ester de l'éosine B et la molécule **BU8**, l'éosine B lactone, possèdent des activités respectives de 238 nM et 2445 nM (**Figure VIII-3**). Ainsi la différence entre la forme ouverte et la lactone dans ce cas est d'un log en défaveur de la lactone.

Une autre lactone, le composé **BU13**, inhibe la recapture du glutamate avec une Cl_{50} de 3850 nM (**Figure VIII-3**). Cette molécule, même si elle ne possède pas de motif xanthène, peut être comparée à l'analogue du RB dépourvu d'atome de chlore sur le cycle phényle (**LSP9-1018**) et son activité de 36 nM. Là encore, une différence d'un log existe entre la lactone et la forme quinone. Ces informations confirment une perte d'activité sur les VGLUTs des modulateurs sous forme lactone.

De plus, l'importance de la fonction acide carboxylique peut être montrée en comparant les activités du Rose Bengale (**LSP9-1019**) et du déoxy Rose Bengale (**BU14**). Ces deux composés possèdent respectivement des Cl_{50} de 25 et 68 nM. Ainsi la perte de la fonction carboxylate ne diminue que faiblement l'activité. En revanche, le remplacement d'une fonction carboxylate par une fonction acide sulfonique engendre une diminution d'activité puisque le composé **BU15** a une activité supérieure à 32 000 nM.

Une comparaison entre quatre molécules peut être réalisée pour confirmer que la fonction acide carboxylique possède peu d'effet sur l'activité de recapture du glutamate. Ces molécules sont le Rose Bengale (**LSP9-1019**), l'ester méthylique du Rose Bengale (**BU1**), l'ester benzylique du Rose Bengale (**BU2**) et l'ester éthylique du Rose Bengale (**LSP9-1037**), qui possèdent des activités respectives de 25, 44, 65 et 192 nM. Au regard des structures, il semblerait qu'il n'y ait pas de corrélation entre une augmentation de l'encombrement stérique et une perte d'activité puisque l'ester éthylique est moins actif que l'ester benzylique, lui-même moins actif que l'ester méthylique. Cette information est confirmée par la comparaison de molécules possédant des groupements esters différents. Ainsi, l'ester éthylique de **BU9** possède une meilleure activité que l'ester méthylique de **BU10** puisqu'ils inhibent les VGLUTs avec des Cl_{50} respectives de 65 et 117 nM.

Ces différentes observations sont autant d'arguments pour conclure que la forme bioactive du Rose Bengale est la forme acide carboxylique. De plus, à pH physiologique, nous avons montré que les analogues du Rose Bengale existent exclusivement sous forme monoanionique (**Paragraphe VII.1.c**). Cette information, mise en parallèle avec une diminution de l'activité des colorants dépourvus d'acide carboxylique (**BU14**) et des colorants dont cette fonction est engagée dans une liaison ester (**BU1**, **BU2**), indique l'importance de la charge négative portée par le carboxylate sur la capacité à inhiber les VGLUTs.

VIII.2.b.ii Activités et substituants du motif xanthène

Bole *et al.* ont montré en 2005 que les positions R_5 et R_6 nécessitent la présence d'halogènes et particulièrement d'atomes d'iodes pour une bonne activité inhibitrice du transport du glutamate.³⁵⁵

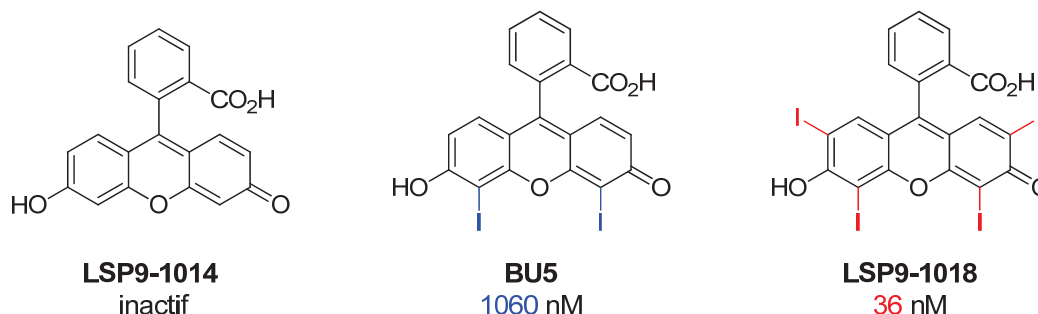


Figure VIII-4 : Halogénations du motif xanthène et activités

En effet, la fluorescéine (**LSP9-1014**) ne possède aucune activité sur les VGLUTs. L'ajout de deux atomes d'iodes en position R_6 du motif xanthène confère une activité de 1060 nM au composé **BU5**. Le motif xanthène possédant quatre atomes d'iodes sur le cycle xanthène permet à la molécule **LSP9-1018** d'avoir une activité de 36 nM (**Figure VIII-4**).

La diminution d'activité des composés est corrélée avec la nature des substituants portés en *ortho* des fonctions hydroxyles et des fonctions cétones. Ainsi, la substitution des iodes du Rose Bengale (**LSP9-1019**, Cl_{50} = 25 nM) par des atomes de bromes confère à la Phloxine B (**BU6**, Cl_{50} = 51 nM) une activité diminuée de moitié alors que le remplacement des halogènes par des hydrogènes conduit à une perte d'activité de 2 logs pour le composé **BU11** (Cl_{50} = 15000 nM). De la même manière, alors que le composé **LSP9-1018**,

ayant un motif xanthène substitué par quatre atomes d'iodes, inhibe les transporteurs vésiculaires avec une CI_{50} de 36 nM, le remplacement de deux iodes en position R_5 par deux groupements méthyles confère au composé **LSP7-1050** une activité diminuée d'un facteur 15 (CI_{50} = 531 nM).

Cependant, les halogènes ne sont pas les seuls substituants du motif xanthène à influencer sur l'activité. Des molécules possédant des groupements naphtyles sur le motif xanthène tels que les composés **LSP9-1022** et **LSP9-1032** n'ont aucune activité sur le transport vésiculaire du glutamate. Une telle substitution a pour effet d'encombrer la molécule. Ainsi, la libre rotation de la liaison carbone-carbone liant le motif xanthène et le cycle phényle est bloquée. Ce blocage entraîne une diminution de l'accessibilité de la charge négative du carboxylate importante pour une bonne capacité inhibitrice.

Au regard de ces informations, il apparaît que les substituants portés par le motif xanthène jouent un rôle important dans l'activité des dérivés de fluorescéine à inhiber les VGLUTs, notamment par la présence d'halogènes en position R_5 et R_6 .

VIII.2.b.iii Activités et substitutions du cycle phényle

Outre la présence d'halogènes sur le motif xanthène, les substituants portés par le cycle phényle (R_1 , R_2 , R_3 et R_4) ont une influence sur la capacité des analogues du Rose Bengale à inhiber la recapture vésiculaire du glutamate.

Le cycle phényle de ces molécules ne peut être remplacé par un chaîne alkyle sous peine d'une diminution importante d'activité au regard de la CI_{50} du composé **BU4** dont la valeur est 2200 nM.

Même si la présence de quatre atomes de chlore sur le cycle phényle du composé Rose Bengale (CI_{50} = 25 nM) ne semble pas être indispensable, au regard des activités des composés substitués par deux atomes de chlore (**LSP7-1069**, CI_{50} = 27 nM), quatre atomes d'hydrogènes (**LSP9-1018**, CI_{50} = 36 nM), quatre atomes de brome (**LSP7-1074**, CI_{50} = 74 nM) et quatre atomes de fluor (**LSP7-1066**, CI_{50} = 102 nM), il reste néanmoins le composé possédant la meilleure activité (**Figure VIII-5**).

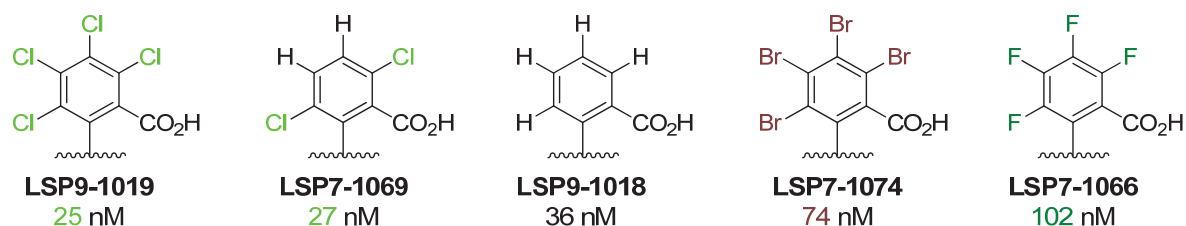


Figure VIII-5 : Activités en fonction des substituants du cycle phényle

Hormis, une faible baisse d'activité entre les composés portant des substituants chlore (**Rose Bengale** et **LSP7-1069**), brome (**LSP7-1074**) et fluor (**LSP7-1066**), toute autre substitution a un effet délétère sur l'activité. En effet, l'introduction de groupements polaires, tels qu'un hydroxyle en position R_{2-3} (**LSP7-1077**, CI_{50} = 7800 nM), ou un groupement nitro en position R_{1-4} (**LSP7-1047**, CI_{50} = 6690 nM), engendre une diminution importante d'activité comparée au composé substitué par quatre hydrogènes (**LSP9-1018**, CI_{50} = 36 nM).

Une forte baisse de cette activité peut aussi être notée pour les composés possédant un substituant hydrophobe. Ainsi, la présence d'un groupement *tert*-butyle en position R₁₋₄ confère au composé **LSP7-1068** une activité de 5925 nM. Une différence d'activité d'un facteur 30 a pu être caractérisée à la défaveur du composé **LSP7-1070** (Cl₅₀ = 987 nM), qui possède un méthyle en position R₂₋₃, comparé aux hydrogènes du composé **LSP9-1018** (Cl₅₀ = 36 nM).

VIII.2.b.iv Conclusions

Ce travail d'études de relation structure-activité a permis de mettre en exergue les principales caractéristiques des dérivés du Rose Bengale pour une inhibition des VGLUTs. Ainsi, la présence d'halogènes sur le motif xanthène est nécessaire. Sur le cycle phényle, ces atomes ne sont pas indispensables mais ils confèrent une meilleure activité. La nécessité de porter des halogènes pourrait s'expliquer par les travaux de Lu *et al.*, qui ont montré l'existence d'interactions spécifiques entre les halogènes et les oxygènes des protéines.⁵⁰⁶ Ces interactions pourraient être impliquées dans la formation de complexes entre le Rose Bengale et le transporteur vésiculaire de glutamate.

De plus, les composés estérifiés ou plus encore décarboxylés présentent une bonne activité d'inhibition des VGLUTs. Il semblerait alors que la fonction carboxylique ne soit pas un substituant indispensable à l'activité, même si la présence de la charge négative leur confère une capacité légèrement accrue d'inhibition des VGLUTs. Cependant, de par son caractère polaire et sa capacité à solvater les molécules d'eau, cette fonction permet une meilleure solubilisation des analogues de Rose Bengale, très hydrophobe à cause de la présence de motifs polyaromatiques. Cette fonction acide carboxylique présente aussi l'avantage de pouvoir envisager une fonctionnalisation par estérification. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs tiré profit de ces propriétés pour développer des analogues fluorescents du Rose Bengale.⁵⁰⁷

VIII.2.c Pharmacologie des analogues de Rose Bengale sur VMAT2 et VACHT

Afin d'évaluer la potentialité des dérivés du Rose Bengale comme marqueurs et/ou modulateurs des VGLUTs, une étude de spécificité de ce composé vis-à-vis d'autres transporteurs de neurotransmetteurs de la famille des SLC18 a été menée.¹³⁶ Pour se faire, l'efficacité du Rose Bengale à inhiber l'accumulation vésiculaire de monoamines *via* VMAT2 et d'acétylcholine *via* VACHT a été quantifiée.^{508, 509}

Comme il l'a été décrit précédemment (**Paragraphe VIII.2.a**), le Rose Bengale (**LSP9-1019**) inhibe la recapture vésiculaire du glutamate avec une Cl₅₀ de 25 nM, mais il est aussi capable d'inhiber l'accumulation H⁺-dépendante de [³H]-5HT avec une activité de 645 nM. De plus, son effet sur la recapture d'acétylcholine est faible, puisque sa Cl₅₀ est supérieure à 9,7 μM (**Figure VIII-6**).³⁵⁶

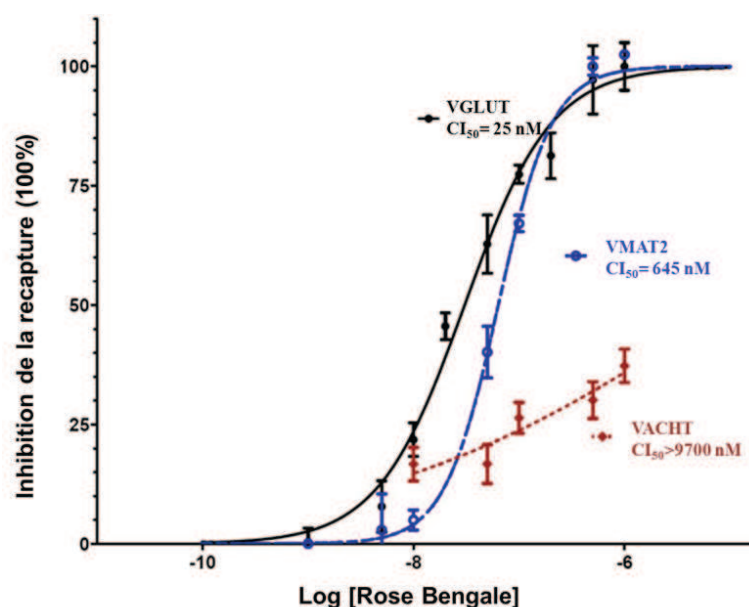
Ainsi, le Rose Bengale inhibe les VGLUTs, appartenant à la famille des SLC-17, mais aussi deux membres de la famille SLC18.

506. Lu, Y. X., *et al. J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2854-2862.

507. Carreon, J. R., *et al. Org. Lett.* **2005**, 7, 99-102.

508. Amilhon, B., *et al. Med. Sci. (Paris)*. **2008**, 24, 1009-1011.

509. Fredriksson, R., *et al. FEBS Lett.* **2008**, 582, 3811-3816.



VGLUT : Transporteur vésiculaire du glutamate
 VMAT2 : Transporteur vésiculaire de monoamine 2
 VACHT : Transporteur vésiculaire d'acétylcholine

Figure VIII-6 : Inhibition de la recapture de neurotransmetteurs par le Rose Bengale³⁵⁶

Le vesamicol est le meilleur inhibiteur connu de VACHT ($CI_{50} = 17 \text{ nM}$), pourtant cet inhibiteur non compétitif ne possède aucune activité sur le transport de monoamines.⁵¹⁰ Ainsi, et au vu de son inhibition plus importante pour VMAT2, il semblerait que le Rose Bengale serait un outil intéressant pour étudier les différences entre le mécanisme des transporteurs de monoamines et celui des transporteurs d'acétylcholine.¹³⁴

Actuellement certaines questions restent en suspens, notamment le mode d'action du Rose Bengale et de ses analogues. Bien que Ogita *et al.* aient partiellement abordé cette question et qu'ils aient éliminé une action sur les canaux Na^+/K^+ ainsi que sur la V-ATPase, aucune réponse univoque n'a été apportée.⁵¹¹ Au regard du fait que le Rose Bengale est décrit comme étant un inhibiteur non-compétitif des VGLUTs, il a été envisagé la possibilité que ce colorant bloque indirectement la recapture du glutamate en interagissant avec d'autres protéines nécessaires à la recapture du neurotransmetteur par les VGLUTs.

A titre d'exemple, Mautner *et al.* ont montré que l'éosine (**BU7**) inhibe l'acétylcholine transférase de manière non compétitive en se fixant sur le site de liaison de l'adénosine avec une K_i de $8 \mu\text{M}$.⁵¹² De plus, des études menées sur l'éosine ($CI_{50} = 406 \text{ nM}$ sur VGLUTs) ont permis de caractériser le mode d'action de cet inhibiteur qui agit par compétition avec l'ATP de la pompe Na^+ -ATPase ($CI_{50} = 19 \mu\text{M}$).⁵¹³

510. Meyer, E. M., *et al. Neurochem. Res.* **1993**, 18, 1067-1072.

511. Ogita, K., *et al. J. Neurochem.* **2001**, 77, 34-42.

512. Mautner, H. G., *et al. J. Med. Chem.* **1981**, 24, 1534-1537.

513. Hopkins, S. C., *et al. Biochemistry.* **2000**, 39, 2805-14.

Les différentes études réalisées jusqu'alors témoignent de l'inhibition des analogues du Rose Bengale, mais elles n'apportent pas d'information sur leurs sites de liaison potentiels.^{356, 513-518}

Au regard de ces informations, il se pourrait que le Rose Bengale inhibe de façon compétitive un site de fixation de l'ATP ou de l'AMP/ADP autre que la V-ATPase comme c'est le cas chez d'autres analogues de fluorescéine.⁵¹³⁻⁵¹⁷

VIII.2.d Conclusions

Les informations recueillies lors des études de relation structure-activité ont permis au Dr Nicolas TRIBALLEAU de générer un modèle de pharmacophore basé sur le Rose Bengale qui confirme la nécessité de porter des halogènes sur le cycle phényle et sur le motif xanthène pour une bonne activité inhibitrice des transporteurs vésiculaires du glutamate (**Figure VIII-7**).

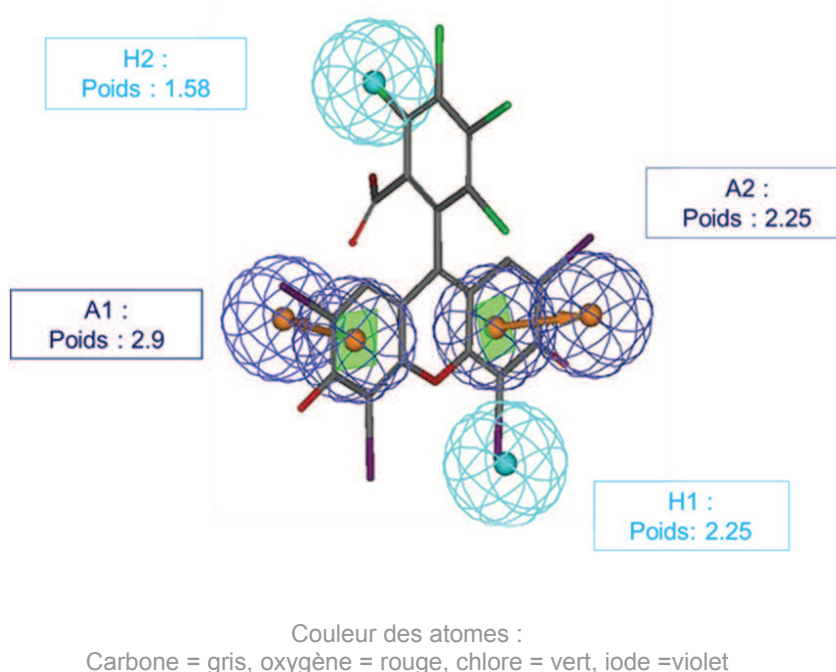


Figure VIII-7 : Modèle de pharmacophore des VGLUTs basé sur le Rose Bengale³⁵⁶

Ce modèle possède quatre points pharmacophoriques principaux. Tout d'abord, deux sont situés sur le motif xanthène nommé A1 et A2. Ces deux points pharmacophoriques sont situés de part et d'autre d'un axe passant par le carbone C₉ et l'oxygène intracyclique. Les poids de ces points sont respectivement de 2,9 et 2,25 pour A1 et A2. Deux autres points pharmacophoriques ont pu être déterminés, le point H1 correspondant à la position R₅ du motif xanthène (poids : 2,25) et le point H2 localisé sur le cycle phényle

514. Karlish, S. J. D. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1980**, 12, 111-136.
515. Neslund, G. G., et al. *Curr. Top. Cell. Regul.* **1984**, 24, 447-469.
516. Deweille, J. R., et al. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4557-4563.
517. Cai, Z. W., et al. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 19546-19553.
518. Ogan, J. T., et al. *Blood Cell. Mol. Dis.* **2007**, 38, 229-237.

(poids : 1,58), cycle qui est lui-même dans un plan perpendiculaire au motif xanthène. Au regard de ces informations, les deux cycles aromatiques du xanthène, pour lesquels la somme des points pharmacophoriques vaut 5,15, montrent l'importance de la planéité du xanthène.

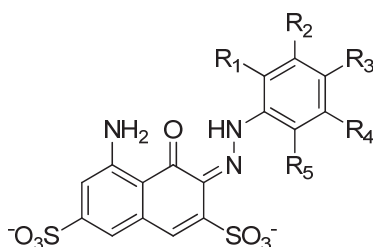
L'étude de l'inhibition des VGLUTs par le Rose Bengale ouvre alors la voie au développement de molécules sélectives des VGLUTs.

VIII.3 Evaluation de la capacité inhibitrice des analogues du Bleu Trypan

VIII.3.a Pharmacologie des transporteurs vésiculaires du glutamate

L'activité inhibitrice des analogues du Bleu Trypan est déterminée par la quantification de leur capacité à bloquer la recapture du [^3H]-L-glutamate dans les vésicules synaptiques. Les résultats sont reportés en pourcentage d'inhibition et résumés dans le **Tableau VIII-2**.

Tableau VIII-2 : Activités des colorants monoazoïques série acides carboxyliques et halogènes (substituant R₃)



| Référence | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ | R ₅ | % d'inhibition de [^3H]-L-Glu à 20 μM | Cl ₅₀ en μM |
|-----------|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|---|-----------------------------------|
| LSP9-2119 | CF ₃ | H | I | H | H | 79 | 2,4 |
| LSP9-3041 | CF ₃ | H | COOH | H | H | 76 | / |
| LSP9-2114 | CH ₃ | H | I | H | H | 76 | / |
| LSP9-2125 | CH ₃ | H | Br | H | CH ₃ | 65 | 4,3 |
| LSP9-2126 | F | H | I | H | H | 51 | / |
| LSP9-2192 | Cl | H | COOH | H | H | 48 | / |
| LSP9-2122 | OCH ₃ | H | Br | H | H | 45 | / |
| LSP9-2137 | OCH ₃ | H | COOH | H | H | 35 | / |
| LSP9-2135 | F | H | COOH | H | H | 32 | / |
| LSP9-2179 | Cl | H | I | H | H | 31 | / |
| LSP9-2120 | H | H | Br | H | H | 30 | / |
| LSP9-3031 | F | F | COOH | F | OH | 21 | / |
| LSP9-2177 | H | H | COOH | H | H | 15 | / |
| LSP9-3032 | F | F | Br | F | OH | 14 | / |
| LSP9-2139 | CH ₃ | H | COOH | H | CH ₃ | 5 | / |
| LSP9-2129 | CH ₃ | H | COOH | H | H | 0 | / |

L'évaluation des colorants monoazoïques, de série acides carboxyliques et de série halogènes (**Paragraphe VII.2.e.ii**), a été réalisée à la concentration de 20 μM de [^3H]-L-glutamate. Aucun de ces

composés ne s'est révélé avoir une CI_{50} inférieure à 2,4 μ M. Mais l'étude de relation structure-activité de ces molécules permet l'accès à certaines caractéristiques nécessaires à l'inhibition des VGLUTs.

Parmi les colorants appartenant à cette série des composés monoazoïques dérivés d'acides carboxyliques et halogènes, la molécule possédant un groupement trifluorométhyle en position R_1 et un atome d'iode en position R_3 (**LSP9-2119**) est celle qui possède la meilleure activité. Elle inhibe la recapture du glutamate à hauteur de 79 % et à une CI_{50} de 2,4 μ M. Son homologue, portant une fonction acide carboxylique en position R_3 , possède lui aussi une des meilleures activités des colorants monoazoïques puisqu'il inhibe à 76 % la recapture du 3H -L-glutamate.

Au regard des informations fournies par l'évaluation de ces molécules, il apparaît que la présence d'une fonction acide carboxylique ou d'un halogène en position R_3 ne possède pas une influence importante sur la capacité à inhiber la recapture du glutamate par les VGLUTs.

Les composés **LSP9-2114** et **LSP9-2129** portent en position R_1 un groupement méthyle et en position R_3 respectivement un atome d'iode et une fonction acide carboxylique. Alors que la présence d'un halogène confère au colorant **LSP9-2114** une capacité d'inhibition de 76 %, le composé **LSP9-2129** est inactif. La même différence est observée avec la substitution du brome du composé **LSP9-2125** ($R_1 = R_5 = CH_3$) par une fonction acide carboxylique sur le composé **LSP9-2139** ($R_1 = R_5 = CH_3$). L'inhibition du colorant halogéné a été mesurée à 65 % alors que celle du carboxylate est de 5 %. En comparant deux à deux les composés possédant des substituants identiques en position R_1 et R_5 , dans six cas sur huit, la molécule portant un atome d'halogène inhibe mieux la recapture du glutamate par les VGLUTs. Ces informations indiquent que la présence d'une charge négative au niveau de ce cycle aromatique n'est pas nécessaire pour la liaison au site actif.

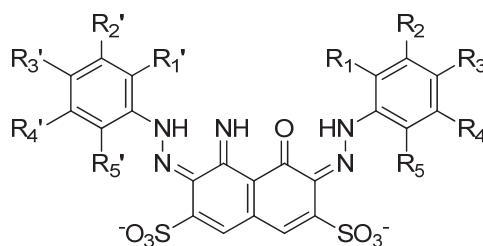
Le composé **LSP9-2119** diffère du composé **LSP9-2114** par le remplacement d'un groupement trifluorométhyle par un groupement méthyle en position R_1 . Cette substitution a un faible impact sur l'inhibition puisque le composé **LSP9-2114** inhibe à 76 % les VGLUTs alors que le composé **LSP9-2119** inhibe à 79 %. Ces informations laissent à penser que le volume de ces deux groupements a un rôle important dans la liaison au transporteur. Cette hypothèse est confirmée avec les faibles activités des composés **LSP9-2120** et **LSP9-2177** portant un hydrogène sur la position R_1 . De façon similaire, le composé **LSP9-2125**, portant deux groupements méthyles sur les positions R_1 et R_5 , inhibe la recapture du glutamate à hauteur de 65 %.

Outre l'influence de la position R_1 et R_5 sur l'activité, cette étude a permis de révéler que la présence d'un groupement polaire en position R_1 , telle que la fonction méthoxy (**LSP9-2122**, **LSP9-2137**) ou en position R_5 (**LSP9-3031**, **LSP9-3032**), telle qu'une fonction hydroxy, réduit l'activité.

Les colorants monoazoïques de série halogénée et acide carboxylique ont une activité modérée de l'ordre du micromolaire sur les VGLUTs. En revanche, l'évaluation de ces composés permet d'apporter des précisions quant aux substituants nécessaires à l'inhibition. Ainsi, la présence d'halogènes en position R_1 et R_3 permet une meilleure inhibition des VGLUTs.

L'évaluation des deux colorants disazoïques de série acides carboxyliques et de série halogènes, a été réalisée à la concentration de 20 μ M de $[^3H]$ -L-glutamate. Les activités de ces composés sont résumées dans le **Tableau VIII-3**.

Tableau VIII-3 : Activités des colorants disazoïques

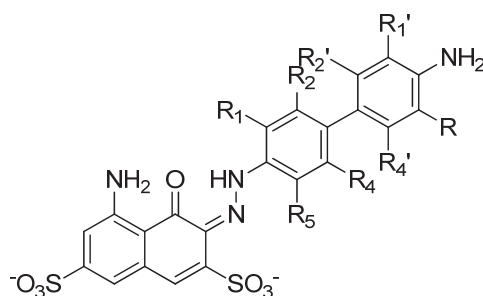


| Référence | R ₁ -R _{1'} | R ₂ -R _{2'} | R ₃ -R _{3'} | R ₄ -R _{4'} | R ₅ -R _{5'} | % d'inhibition de [³ H]-L-Glu à 20 µM |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| LSP9-3084 | F | H | COOH | H | H | 65 |
| LSP9-3083 | F | H | I | H | H | 37 |

Les deux colorants disazoïques possèdent des activités similaires à leurs analogues monoazoïques. Contrairement à ce qui a pu être observé précédemment, le composé **LSP9-3084** substitué en position R₃ et R_{3'} par des fonctions acides carboxyliques possède une meilleure activité que le composé substitué par des halogènes (**LSP9-3083**). Ceci laisse à penser que la présence de deux fonctions acides carboxyliques permettrait d'augmenter la solubilité des colorants qui ont tendance à s'agréger par l'augmentation de l'hydrophobicité imputable à la présence de quatre cycles aromatiques.

Les valeurs des activités des colorants monoazoïques biaryles sont résumées dans le **Tableau VIII-4**.

Tableau VIII-4 : Activités des colorants monoazoïques biaryles

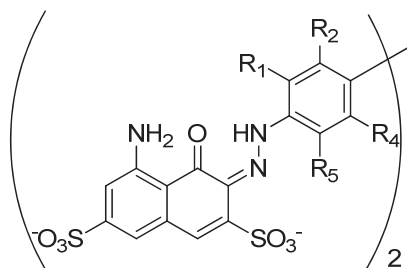


| Référence | R ₁ -R _{1'} | R ₂ -R _{2'} | R ₄ -R _{4'} | R ₅ -R _{5'} | % d'inhibition de [³ H]-L-Glu à 20 µM | Cl ₅₀ en µM |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|------------------------|
| LSP9-3070 | CF ₃ | H | H | H | 100 | En cours |
| LSP9-3083 | F | F | F | F | 100 | En cours |
| LSP9-3075 | Cl | H | H | H | 80 | 1,47 |
| LSP9-3073 | F | H | H | H | 70 | 5,9 |
| LSP9-3073 | CH ₃ | H | H | H | 45 | En cours |
| LSP9-2142 | H | H | H | H | 25 | En cours |

Alors que les colorants mono- et disazoïques possèdent des activités modérées, un gain notable d'inhibition a pu être observé pour la série des colorants monoazoïques biaryles. Deux colorants polyhalogénés inhibent à 100 % la recapture du glutamate à 20 μM . Le colorant **LSP9-3070** porte en position R_1 et R_1' des groupements trifluorométhyles. Ce groupement s'est déjà avéré être potentiateur de l'activité de colorant monoazoïque halogéné (**LSP9-2119**) et acide carboxylique (**LSP9-3041**). De façon identique à ce que Carrigan *et al.* ont pu observer, la présence d'un motif biaryle permet de gagner de l'activité.³⁴⁵ En effet, les colorants monoazoïques possédant un chlore en R_1 inhibent à 48 % (**LSP9-2192**) et 31 % (**LSP9-2179**), alors que le composé biaryle chloré en position, R_1 et R_1' (**LSP9-3075**) inhibe à 80 % la recapture du glutamate à 20 μM . Un même constat peut être établi en comparant les colorants monoazoïques substitués par un fluor en position R_1 (**LSP9-2126**, **LSP9-2135**) et le composé biaryle fluoré en R_1 et R_1' (**LSP9-3073**). L'activité est augmentée de 20 à 40 % dans le cas du colorant biaryle. Outre, la présence d'halogènes, un motif biaryle substitué lié au motif naphthalène-sulfonique par une liaison azoïque permet un gain important d'activité.

Une première évaluation des colorants diazoïques, c'est-à-dire des analogues structuraux du Bleu Trypan, a été réalisée à la concentration de 1 μM de [^3H]-L-glutamate. Pour quatre colorants, l'évaluation a été réalisée à 100 nM de glutamate tritié. Les activités de ces composés sont résumées dans le **Tableau VIII-5**.

Tableau VIII-5 : Activités des colorants diazoïques



| Référence | R_1 | R_2 | R_4 | R_5 | % d'inhibition de [^3H]-L-Glu à 1 μM | % d'inhibition de [^3H]-L-Glu à 100 nM |
|---------------------|----------------|-------|-------|---------------|--|---|
| LSP9-2103 | Cl | H | H | H | 74 | 37 |
| LSP9-3079 | H | H | H | H | 100 | 60 |
| LSP9-2097/BT | CH_3 | H | H | H | 100 | 50 |
| LSP9-2107 | OCH_3 | H | H | H | 50 | 34 |
| LSP9-2106 | CH_3 | H | H | CH_3 | En cours | En cours |
| LSP9-2105 | F | H | H | H | En cours | En cours |
| LSP9-1148 | F | F | F | F | En cours | En cours |
| LSP9-3076 | CF_3 | H | H | H | En cours | En cours |

Les colorants appartenant à la famille des analogues stricts du Bleu Trypan possèdent de meilleures activités que les colorants précédemment décrits. Ces molécules, à 20 μM de [^3H]-L-glutamate, inhibent à

100 % le transport vésiculaire du glutamate. Le Bleu Trypan (**LSP9-2097**) est le meilleur inhibiteur compétitif connu des VGLUTs, il inhibe à hauteur de 50 % la recapture de glutamate à la concentration de 100 nM. Un colorant diazoïque s'est révélé avoir une meilleure activité que le Bleu Trypan. En effet, le colorant possédant huit atomes d'hydrogène sur le motif biaryle (**LSP9-3079**), inhibe à 60 % les VGLUTs (à 100 nM). Les colorants substitués par un atome de chlore (R_1 et/ou R_1') sont de bons témoins du gain d'activité lié à la taille des molécules. Le colorant monoazoïque en série acide carboxylique possède une capacité d'inhibition de près de 50 % sur les VGLUTs à 20 μ M (**LSP9-2192**), l'augmentation de la taille de cette molécule par l'ajout d'un cycle aromatique chloré permet un gain de 30 % d'activité à 20 μ M. Lorsqu'un motif naphthalène-sulfonique est greffé sur le composé (**LSP9-3075**), il y a un gain important d'activité puisqu'il inhibe à 37 % la recapture du glutamate à 100 nM. Un parallèle peut être réalisé avec les colorants substitués par des hydrogènes sur les positions R_1 et R_1' puisque le composé monoazoïque biaryle n'inhibe qu'à hauteur de 25 % à 20 μ M et son homologue en série colorants diazoïques inhibe à 60 % à 100 nM.

VIII.3.b Pharmacologie des récepteurs métabotropiques du glutamate

Afin de rationaliser ces informations et d'appréhender la sélectivité de ces composés, sept des meilleurs analogues, appartenant aux trois familles de colorants dérivés du Bleu Trypan, ont été évalués sur les huit sous-types de récepteurs métabotropiques. Ces molécules ne possèdent que de faibles effets agonistes sur les mGluRs à 1 mM.

| Taux d'inhibition en % | 0-25 | | | | 25-50 | | | | 50-75 | | | | 75-100 | | | |
|------------------------|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|-----|
| | mGlu1 | | mGlu2 | | mGlu3 | | mGlu4 | | mGlu5 | | mGlu6 | | mGlu7 | | mGlu8 | |
| Effet antagoniste | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM | 0,2mM | 1mM |
| LSP9-3079 | 20 | 100 | 0 | 39 | 0 | 53 | 65 | 100 | 0 | 67 | 0 | 58 | NC | NC | 18 | 69 |
| LSP9-2114 | EC | EC | EC | EC | EC | EC | 9 | 63 | EC | EC | EC | EC | 0 | 54 | 0 | 12 |
| LSP9-2120 | EC | EC | EC | EC | EC | EC | 0 | 39 | EC | EC | 0 | 13 | 0 | 16 | EC | EC |
| LSP9-2177 | EC | EC | EC | EC | EC | EC | 0 | 13 | EC | EC | EC | EC | EC | EC | EC | EC |
| LSP9-2158 | 14 | 49 | 0 | 34 | NC | NC | 18 | 55 | 0 | 17 | 0 | 100 | NC | NC | 20 | 57 |
| Bleu Trypan | EC | EC | EC | EC | EC | EC | 43 | 93 | EC | EC | EC | EC | EC | EC | 11 | 22 |
| 2164 | 19 | NC | EC | EC | EC | EC | 49 | 100 | EC | EC | EC | EC | EC | EC | 16 | NC |

Taux d'inhibition exprimé en % de l'effet maximum de l'agoniste contrôle, EC : En cours, NC, non communiqué.

Figure VIII-8 : Evaluation de l'effet antagoniste d'analogues du Bleu Trypan sur les mGluRs

Un colorant diazoïque, possédant huit atomes d'hydrogène sur le motif biaryle (**LSP9-3079**), possède un effet antagoniste non négligeable sur les récepteurs mGluRs et plus particulièrement sur mGlu1 et mGlu4 (**Figure VIII-8**). Cette molécule inhibe à 100 % de l'effet maximal de l'agoniste à la concentration de 1 mM et

à 65 % à 200 μ M. De même, les composés **LSP9-2179** et **LSP9-2097** (Bleu Trypan) possèdent des activités antagonistes, principalement sur mGlu4 (**Figure VIII-8**).

Cependant, l'ensemble de ces activités ne sont pas incompatibles avec l'utilisation de ces composés *in vivo* puisque l'indice de sélectivité est supérieur à 3 logs.

VIII.4 Conclusions

L'étude de relation structure-activité a montré que l'optimisation du synthon Rose Bengale n'est pas une tâche facile. Ces difficultés sont principalement dues à la présence d'halogènes et à la faible possibilité de variation de substituants qui en font des structures difficilement optimisables. En effet, différentes substitutions réalisées ont malheureusement conduit à des effets délétères de l'activité des VGLUTs. Cette étude a également permis de mettre en évidence que la charge de la fonction carboxylate n'est pas essentielle à l'activité. La synthèse d'analogues contraints sous forme lactone et « ouverte » a permis de caractériser qu'à pH physiologique les analogues de Rose Bengale sont exclusivement sous forme « ouverte » acide et représente la forme bioactive.

Les études de pharmacologie ont permis de révéler la relative faible sélectivité du Rose Bengale pour les VGLUTs. La présence sur les transporteurs vésiculaires du glutamate et des monoamines d'un site de liaison à haute affinité pour le Rose Bengale est un point de départ intéressant pour de nouvelles recherches. Ce site est peut être un site allostérique où il est situé sur une autre protéine nécessaire à la recapture vésiculaire du glutamate.

Ce travail confirme l'intérêt d'utiliser le Rose Bengale et ses analogues comme inhibiteurs des VGLUTs mais surtout comme outils pharmacologiques pour l'étude de la recapture de neurotransmetteurs. En particulier pour approfondir les mécanismes d'action dans lesquels VGLUTs (ou VMAT2) et VACHT sont impliqués.¹³⁴

L'évaluation de la capacité des analogues du Bleu Trypan à inhiber les VGLUTs a permis de montrer que la taille des colorants joue un rôle essentiel dans l'activité. Il semblerait que les analogues stricts, du composé de référence, empêchent le pore de se refermer une fois l'inhibiteur lié au site actif. Cette information explique la perte d'activité constatée lors de la diminution de la taille des colorants. De plus, ce travail a pu mettre en exergue, tout comme pour les colorants de type Rose Bengale, que la présence de groupements hydrophobes augmente, de façon notoire, l'activité des composés. Les premières études de sélectivité réalisées indiquent qu'à des concentrations micromolaires, les analogues du Bleu Trypan n'inhibent pas les récepteurs métabotropiques du glutamate. Cependant, des études de sélectivité vis-à-vis des transporteurs vésiculaires de monoamines *via* VMAT2 et d'acétylcholine *via* VACHT sont nécessaires pour appréhender la sélectivité de tels inhibiteurs sur les vésicules synaptiques.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) ont été identifiés dans les années 2000 et leur implication dans de nombreuses pathologies du système nerveux central a été décrite. Ainsi, l'intérêt de cibler et/ou de moduler leur activité semble de plus en plus pertinent afin de mieux comprendre leur fonction physiopathologique. Récemment, une diminution de ces transporteurs corrélée à la physiologie de la maladie d'Alzheimer (score de démence) a été caractérisée. Ces protéines seraient alors des biomarqueurs appropriés pour l'imagerie médicale. Ainsi, le marquage sélectif des VGLUTs permettrait de quantifier leur expression, par imagerie fonctionnelle, à l'instar de certains radiotraceurs utilisés en neuropsychiatrie tels que le [^{11}C]raclopride et le [^{18}F]fallypride (antagonistes des récepteurs dopaminergiques).

L'accès à des composés affins et sélectifs des VGLUTs représente donc une voie possible dans la conception de traceurs pour la maladie d'Alzheimer. Cependant, il existe peu de modulateurs ciblant spécifiquement ces protéines. Afin de combler ce manque, nous avons proposé de développer des inhibiteurs de ces transporteurs. Pour se faire, les deux meilleurs inhibiteurs connus ont été sectionnés : le Rose Bengale et le Bleu Trypan.

Dans un premier temps, le travail réalisé sur le Rose Bengale a permis l'optimisation d'une voie de synthèse en deux étapes et le développement d'une chimiothèque de composés analogues. La compréhension de l'étape de polycondensation du motif xanthène a permis de contrôler la première étape ; celle-ci nous a donné accès à un intermédiaire réactionnel ouvrant de nouvelles perspectives quant à l'asymétrisation de ces composés. La synthèse d'analogues du Rose Bengale a pu être concrétisée par halogénéation régiosélective lors d'une seconde étape.

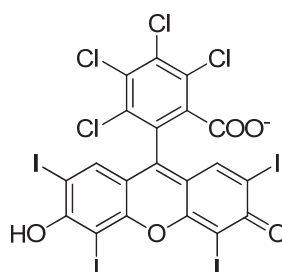


Figure 1 : Forme bioactive du Rose Bengale

En raison de l'existence d'un équilibre tautomérique entre deux formes du Rose Bengale, il nous a semblé essentiel de déterminer la forme prédominante à pH physiologique. La synthèse d'analogues du Rose Bengale contraignant le colorant dans ses deux formes tautomériques (lactone ou acide) a permis de caractériser la forme acide comme la seule existante à pH physiologique. L'évaluation biologique de ces derniers a également révélé que le Rose Bengale sous forme lactone ne possède qu'une faible activité inhibitrice à *contrario* de celle de son homologue anionique acide. Ces informations montrent qu'il n'existe qu'une seule forme bioactive des colorants de la famille du Rose Bengale.

Une méthodologie similaire a été adoptée pour l'optimisation et la génération de colorants azoïques analogues de Bleu Trypan. L'évaluation de la première étape de formation de ces colorants a permis d'apporter des précisions quant à la réactivité de différentes anilines et benzidines vis-à-vis de la réaction de diazotation. La régiosélectivité de la formation de diazonium ainsi que d'analogues de benzidine a permis la réaction sur une seule amine aromatique lors de la deuxième étape de copulation. Cette étape de couplage constitue donc l'étape clé conduisant aux dérivés de type Bleu Trypan. Une nouvelle étude de la régiosélectivité de cette substitution électrophile aromatique, réalisée sur des motifs naphthalène-sulfoniques simplifiés, a conduit à la maîtrise de l'orientation et des conditions opératoires de cette réaction. Ce travail méthodologique est un prérequis nécessaire à la création d'une chimiothèque de composés.

L'évaluation de la capacité inhibitrice de ces deux familles de colorants n'a malheureusement pas permis de caractériser des composés nettement plus efficaces que les têtes de séries. Le Rose Bengale est toujours le meilleur inhibiteur non compétitif et le Bleu Trypan un des meilleurs inhibiteurs compétitifs. Le Rose Bengale semble toutefois être peu sélectif des VGLUTs mais reste un outil pharmacologique intéressant pour l'étude de la neurotransmission glutamatergique et cholinergique.

Les études de relation structure-activité menées sur les analogues du Bleu Trypan ont révélé que les colorants diazoïques (e.g. **LSP9-3079**) sont les molécules possédant la meilleure capacité inhibitrice.

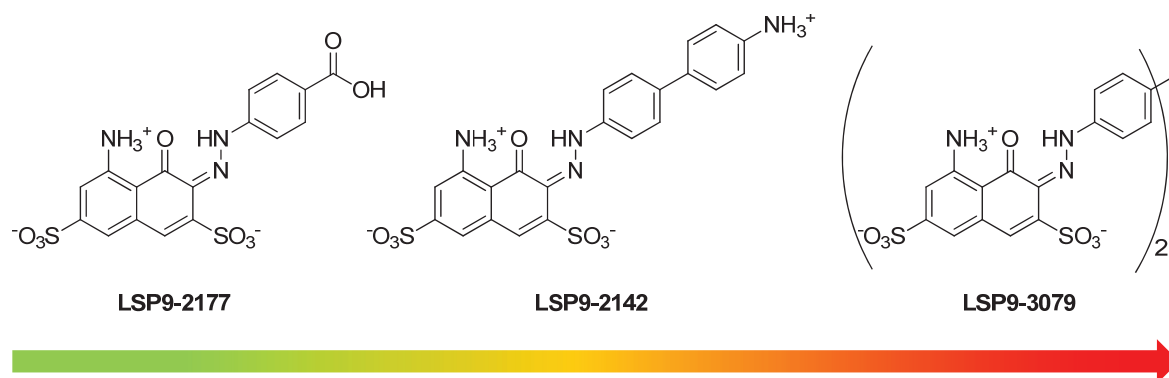


Figure 2 : Activités inhibitrices croissantes des analogues du Bleu Trypan

Les colorants monoazoïques (e.g. **LSP9-2177**) possèdent des activités semblables aux meilleures quinoléines substituées décrites, équivalentes en termes de taille. L'augmentation de la taille de ces colorants par ajout d'un motif biaryle possédant un groupement ionisable (e.g. **LSP9-2142**) leur confère une meilleure activité inhibitrice.

Toutefois, des études de sélectivité de ces colorants azoïques restent nécessaires afin d'appréhender leur capacité à inhiber la recapture d'autres neurotransmetteurs au niveau du système nerveux central et de déterminer leurs interactions avec d'autres transporteurs ou récepteurs au niveau des synapses.

Il reste encore un long chemin à parcourir avant de pouvoir utiliser ces colorants ciblant les VGLUTs comme outils de diagnostic. Cependant, les études mécanistiques et pharmacologiques déjà effectuées ont permis de lever un certain nombre de verrous et de mieux appréhender la conception de telles molécules.

Experimental Part

Experimental Part

Table of contents

| | | |
|--------------------|--|------------|
| <u>IX.1</u> | <u>SYNTHESIS OF ROSE BENGAL ANALOGS</u> | 195 |
| <u>IX.1.a</u> | <u>Synthesis of fluorescein analogs</u> | 196 |
| <u>IX.1.b</u> | <u>Synthesis of Rose Bengal analogs</u> | 200 |
| <u>IX.1.c</u> | <u>Rose Bengal etherification</u> | 203 |
| <u>IX.1.d</u> | <u>Eosin B etherification</u> | 205 |
| <u>IX.1.e</u> | <u>Rose Bengal esterification</u> | 206 |
| <u>IX.1.f</u> | <u>Eosin B esterification</u> | 207 |
| <u>IX.1.g</u> | <u>Eosin B decarboxylation</u> | 208 |
| <u>IX.2</u> | <u>SYNTHESIS OF TRYPAN BLUE ANALOGS</u> | 209 |
| <u>IX.2.a</u> | <u>Anilines and Benzidine synthesis</u> | 212 |
| <u>IX.2.b</u> | <u>Diazotation</u> | 228 |
| <u>IX.2.c</u> | <u>Azoic coupling</u> | 237 |

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS AND SOLVENTS:

All chemicals and solvents were purchased from commercial suppliers (Acros, Aldrich, Alpha Aesar, Apollo Scientific etc) and used as received.

Most solvents were purchased from Carlo Erba-SDS. Solvents for reactions were dried on 4Å molecular sieves (Carlo Erba – SDS) or were distilled.

REACTION MONITORING:

All reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC) on precoated silica on aluminum (Merck 60 F₂₅₄, aluminum sheets) and revealed by UV.

SILICA GEL CHROMATOGRAPHY:

Silica gel chromatography was performed with Silica gel 60 Merck®, 40-63 µm.

Reversed phase TLC were performed using RP-18 F₂₅₄ plates (Merck®), and reversed-phase chromatography with silica gel 100 C₁₈-reversed phase (Fluka®).

PREPARATIVE HPLC:

Compounds were purified on a Gilson analytical instrument with a 321 pump, eluted peaks were detected by a UV-vis 156 detector and retention times are reported in minutes. System was equipped with a Macherey-Nagel Nucleodur® 100-10 C18 (250 mm × 32 mm, 10 µm).

The following gradients were used:

- Gradient P1 is using solvent A: ammonium acetate buffer 0.05 M, solvent B: acetonitrile, 80% A for 4 min, linear increase from 20 to 50% B between 4 and 40 min, 50% A - 50% B from 40 min to 44 min, linear decrease from 50 to 20% B between 44 and 46 min, 80% A between 46 and 56 min. Flow: 8 mL.min⁻¹. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$
- Gradient P2 is using solvent A: ammonium acetate buffer 0.05 M, solvent B: acetonitrile, 80% A for 4 min, linear increase from 20 to 50% B between 4 and 32 min, 50% A - 50% B from 32 min to 47 min, linear decrease from 50 to 20% B between 47 and 50 min, 80% A between 50 and 55 min. Flow: 8 mL.min⁻¹. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$
- Gradient P3 is using solvent A: ammonium acetate buffer 0.05 M, solvent B: acetonitrile, 80% A for 4 min, linear increase from 20 to 45% B between 4 and 35 min, 55% A - 45% B from 35 min to 41 min, linear increase from 45 to 50% B between 41 and 42 min, 50% A - 50% B from 42 min to 44 min, linear decrease from 50 to 20% B between 44 and 46 min, 80% A between 46 and 50 min. Flow: 8 mL.min⁻¹. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$
- Gradient P4 is using solvent A: ammonium acetate buffer 0.05 M, solvent B: acetonitrile, 90% A for 4 min, linear increase from 10 to 25% B between 4 and 35 min, 75% A - 25% B from 35 min to 44 min, linear decrease from 25 to 10% B between 44 and 46 min, 90% A between 46 and 50 min. Flow: 8 mL.min⁻¹. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$

NMR:

^1H (250.13 or 400.13 or 500.16 MHz), ^{13}C (62.9 or 100.62 or 125.78 MHz) and ^{19}F (376.49 MHz) NMR spectra were respectively recorded on an ARX 250 or an Avance II 400 Bruker or an Avance II 500 Bruker spectrometer.

Chemical shifts (δ) are given in δ (ppm) with reference to residual ^1H or ^{13}C of deuterated solvents, respectively CD_3OD 3.31, 49.0; D_2O 4.80 ; CDCl_3 7.24, 77.00 ; $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ 2.05, 29.84 and 206.26 or $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ 2.50, 39.52).

MASS SPECTRA:

Mass spectra (MS) were recorded with a LCQ-advantage (ThermoFinnigan) mass spectrometer with positive (ESI^+) or negative (ESI^-) electrospray ionization (ionization tension 4.5 kV, injection temperature 240 °C).

HPLC-MS:

HPLC-MS analyses were performed on a Thermo Finnigan LCQ Advantage Instrument as described above, equipped for HPLC with a Macherey-Nagel Nucleosil® 100-5 C18 (125 mm \times 4 mm, 4 μm).

Products were eluted as the same manner as described above

ANALYTICAL HPLC:

HPLC analyses were carried out on two devices:

- a Gilson analytical instrument with a 321 pump, column temperature of Nucleosil® columns was controlled with an Igloo-CIL Peltier effect thermostat or column oven Shimadzu CTO-10A, eluted peaks were detected by a UV-vis 156 detector and retention times are reported in minutes.
- a Gilson analytical instrument with a 306/307 pump, column temperature of Nucleosil® columns was controlled with an Igloo-CIL Peltier effect thermostat or column oven Shimadzu CTO-10A, eluted peaks were detected by a UV-vis 155 detector and retention times are reported in minutes.

The following gradients were used:

- For the analysis of Rose Bengal analogs
 - Gradient G1 is using solvent A: water, solvent B: methanol
80% A for 3 min, linear increase from 20 to 80% B between 3 and 15 min, 20% A - 80% B from 15 min to 25min, linear decrease from 80 to 20% B between 25 and 27min, 80% A between 27and 30 min.
- For the analysis of Trypan Blue analogs
 - Gradient G2 is using solvent A: water-formic acid 1%, solvent B: acetonitrile
90% A for 5 min, linear increase from 10 to 60% B between 5 and 22 min, 40% A - 60% B from 22 min to 30 min, linear decrease from 60 to 10% B between 30 and 32 min, 90% A between 32 and 36 min. Flow: 0.75 mL.min⁻¹. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$

- Gradient G3 is using solvent A: acetonitrile, solvent B: TFA 0.08 M, 90% A for 15 min, linear increase from 10 to 90% B between 15 and 23 min, 10% A - 90% B from 23min to 30 min, linear decrease from 90 to 10% B between 30 and 40 min, 90% A between 40 and 45 min. Flow: 0.75 mL.min⁻¹. $\lambda_1 = 254 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 550 \text{ nm}$

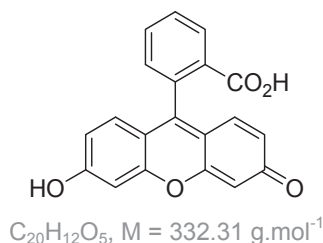
COMPOUNDS PURITY:

Purity of the tested compounds was established by analytical HPLC-MS, by HPLC or by elementary analysis and was at least 95%.

IX.1.a Synthesis of fluorescein analogs

7a-(6'-Hydroxy-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid

LSP9-1014



Following the general procedure A,

Phthalic anhydride (149 mg, 1 mmol), resorcinol (220 mg, 2 mmol)

Compound was obtained as a yellow solid in 12 % yield (40 mg)

Following the general procedure B,

Phthalic anhydride (149 mg, 1 mmol), resorcinol (220 mg, 2 mmol), $ZnCl_2$ (82 mg, 0.6 mmol)

Compound was obtained as a yellow solid in 93 % yield (310 mg)

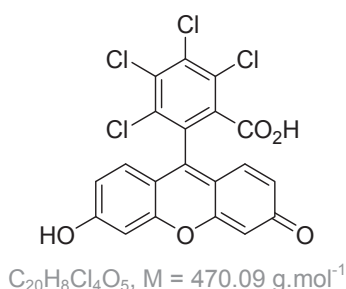
1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.11 (s, 1H, OH), 8.02 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_4), 7.83-7.70 (m, 2H, H_4' , H_5' , H_6), 7.27 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_7), 6.69 (brs, 2H, H_1' , H_8'), 6.56 (m, 4H, H_4' , H_5' , H_2' , H_7')

1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.20 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_4), 7.98-7.85 (m, 2H, H_5' , H_6), 7.40 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_7), 6.87 (d, $J = 2.3$ Hz, 2H, H_1' , H_8'), 6.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H_2' , H_7'), 6.73 (m, 2H, H_4' , H_5')

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 171.5 (Cq), 161.2 (Cq), 161.1 (Cq), 154.0 (Cq), 136.4, 131.0, 130.1, 128.2 (Cq), 125.7, 125.3, 113.4, 111.3 (Cq)

HPLC: $t_R = 11.96$ min

MS (ESI) $^-$: m/z 331.1 $[M-H]^-$

4,5,6,7-Tetrachloro-7a-(6'-hydroxy-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid**LSP9-1017**

Following the general procedure B,

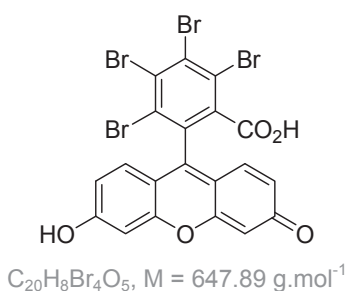
Tetrachlorophthalic anhydride (286 mg, 1 mmol), resorcinol (220 mg, 2 mmol), ZnCl_2 (82 mg, 0.6 mmol)

Compound was obtained as a brown solid in 76% yield (357 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.22 (s, 1H, OH), 6.94 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{1'}$, H_8'), 6.73 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 2H, H_4' , H_5'), 6.57 (m, 2H, H_2' , H_7')

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 163.5, 159.9, 152.0, 148.3, 138.8, 134.9, 134.7, 130.3, 128.9, 127.2, 124.1, 112.6, 106.5, 102.3, 81.7

MS (ESI): m/z 469.7 $[\text{M}-\text{CO}_2\text{H}]^-$

4,5,6,7-Tetrabromo-7a-(6'-hydroxy-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid**LSP9-1025**

Following the general procedure B,

Tetrabromophthalic anhydride (463 mg, 1 mmol), resorcinol (220 mg, 2 mmol), ZnCl_2 (82 mg, 0.6 mmol)

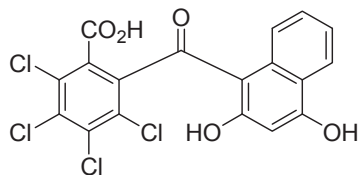
Compound was obtained as a yellow solid in 60% yield (388 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.25 (s, 1H, OH), 6.87 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{1'}$, H_8'), 6.67 (brs, 2H, H_4' , H_5'), 6.56 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, H_2' , H_7')

MS (ESI): m/z 646.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$

2,3,4,5-Tetrachloro-6-(2,4-dihydroxy-1-naphthoyl)benzoic acid

LSP9-1021



Tetrachlorophthalic anhydride (300 mg, 1.05 mmol) and naphtoresorcinol (168 mg, 1.05 mmol) were mixed in nitrobenzene (10 mL) at 0°C. A solution of $AlCl_3$ (613 mg, 4.6 mmol) in nitrobenzene (15 mL) was added dropwise during 1 h. The reaction mixture was continued overnight at 190°C. The mixture was diluted with HCl (0.1M, 25 mL) and cyclohexane (5 mL). The obtained precipitate was filtered off and recrystallized from water and methanol.

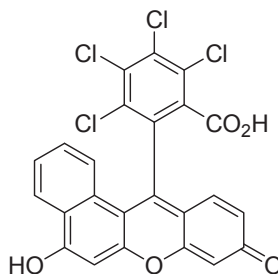
Compound was obtained as a brown solid in 95% yield (256 mg)

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.99 (brs, 2H, OH), 7.97-7.55 (m, 4H, H_7 , H_8 , H_9 , H_{10}) 6.49(s, 1H, H_4)

MS (ESI) $^-$: m/z 445.1 [$M-H$] $^-$

4,5,6,7-Tetrachloro-7a-(9'-hydroxy-5'-oxo-5H-benzo[a]xanthen-12'-yl)benzoic acid

LSP9-1022



Following the general procedure B,

LSP9-1021 (446 mg, 1 mmol), resorcinol (110 mg, 1 mmol), $ZnCl_2$ (41 mg, 0.3 mmol)

Compound was obtained as a yellow solid in 60% yield (312 mg)

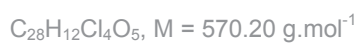
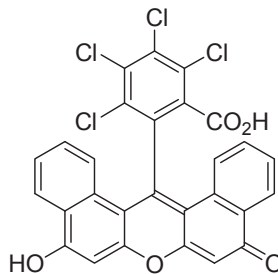
1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.79 (s, 1H, OH), 8.01-7.52 (m, 4H, H_9 , H_{10} , H_{11} , H_{12}), 6.75 (brs, 1H, H_1), 6.60-6.38 (m, 3H, H_2 , H_4 , H_5)

HPLC: $t_R = 15.37 \text{ min}$

MS (ESI) $^-$: m/z 518.8 [$M-H$] $^-$

4,5,6,7-Tetrachloro-7a-(9'-hydroxy-5'-oxo-5H-dibenzo[a,j]xanthen-14'-yl)benzoic acid

LSP9-1032



Following the general procedure B,

LSP9-1021 (446 mg, 1 mmol), naphtoresorcinol (160 mg, 1 mmol), $ZnCl_2$ (41 mg, 0.3 mmol)

Compound was obtained as a brown solid in 63% yield (359 mg)

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 12.07 (s, 1H, OH), 8.01-7.32 (m, 8H, H_9 , $H_{10'}$, $H_{11'}$, $H_{12'}$, $H_{13'}$, $H_{14'}$, $H_{15'}$, $H_{16'}$), 6.65-6.38 (m, 2H, H_4 , H_5)

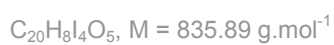
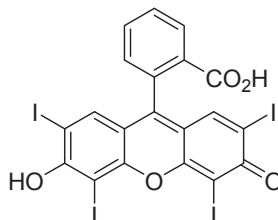
HPLC: $t_R = 15.28 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 569.2 $[M-H]^-$

IX.1.b Synthesis of Rose Bengal analogs

7a-(6'-Hydroxy-2',4',5',7'-tetraiodo-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid

LSP9-1018



Following the general procedure C,

LSP9-1014 (330 mg, 1 mmol), HIO_3 (350 mg, 2 mmol), I_2 (635 mg, 2.5 mmol)

Compound was obtained as a red powder in 60% yield (501 mg)

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.24 (brs, 1H, OH), 8.18 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_4), 7.86-7.78 (m, 2H, H_5 , H_6), 7.46 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, H_7), 7.27 (s, 1H, $H_{1'}$ or $H_{8'}$), 7.02 (s, 1H, $H_{1'}$ or $H_{8'}$)

HPLC: $t_R = 13.35$ min

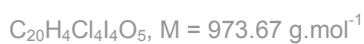
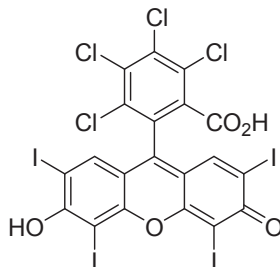
MS (ESI) $^-$: m/z 834.8 $[M-H]^-$

MS (ESI) $^+$: m/z 836.7 $[M+H]^+$

Mp: 297-300°C

4,5,6,7-Tetrachloro-7a-(6'-hydroxy-2',4',5',7'-tetraiodo-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid

LSP9-1019



Following the general procedure C,

LSP9-1017 (471 mg, 1 mmol), HIO_3 (350 mg, 2 mmol), I_2 (635 mg, 2.5 mmol)

Compound was obtained as a red powder in 35 % yield (340 mg)

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.59 (s, 2H, H_1 , H_8)

HPLC: $t_R = 15.80 \text{ min}$

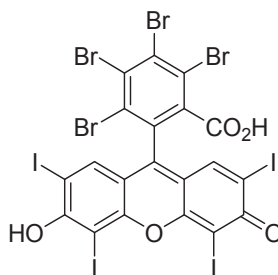
MS (ESI) $^-$: m/z 972.4 $[\text{M}-\text{H}]^-$

MS (ESI) $^+$: m/z 974.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Mp: 297-300°C

4,5,6,7-Tetrabromo-7a-(6'-hydroxy-2',4',5',7'-tetraiodo-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid

LSP9-1026



Following the general procedure C,

LSP9-1025 (650 mg, 1 mmol), HIO_3 (350 mg, 2 mmol), I_2 (635 mg, 2.5 mmol)

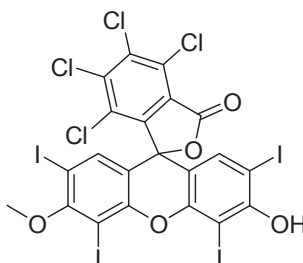
Compound was obtained as a red powder in 30 % yield (345 mg)

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.22 (s, 1H, OH), 7.51 (s, 2H, $H_{1'}$, $H_{8'}$)

HPLC: $t_R = 14.53 \text{ min}$

MS (ESI) $^-$: m/z 1150.2 $[M-H]^-$

Mp: 284-286°C

IX.1.c Rose Bengal etherification**4,5,6,7-Tetrachloro-7a-(2',4',5',7'-tetraiodo-6'-methoxy-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoic acid****LSP9-1031**

Rose Bengal lactone (126 mg, 0.13 mmol) was suspended in DMF (5 mL) with potassium carbonate (40 mg, 0.285 mmol) at 0 °C. Methyl iodide (41 mg, 0.285 mmol) was then added dropwise and stirred at room temperature for 17 h. Residual methyl iodide was quenched by a mixture of ice/water and extracted with EtOAc/ H₂O. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated.

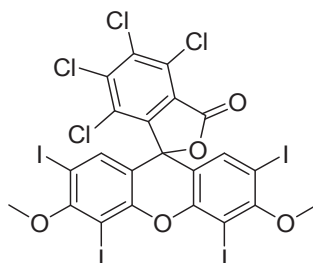
Compound was obtained as a violet solid in 24% yield (31 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9.90 (s, 1H, OH); 7.76 (s, 1H, H_{1'} or H_{8'}); 7.76 (s, 1H, H_{1'} or H_{8'}); 3.88 (s, 3H, CH₃)

HPLC: *t_R* = 10.35 min

MS (ESI): *m/z* 986.5 [M-H]⁻

4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodo-3',6'-dimethoxy-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-one
LSP9-1038



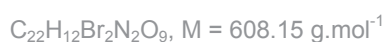
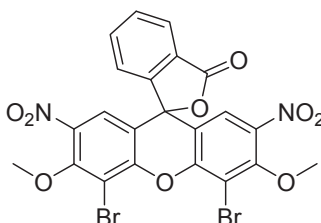
Rose Bengal lactone (152 mg, 0.16 mmol) was suspended in DMF (10 mL) with potassium carbonate (55 mg, 0.4 mmol) at 0 °C. Methyl iodide (68 mg, 0.48 mmol) was then added dropwise and stirred at room temperature for 48 h. Residual methyl iodide was quenched by a mixture of ice/water and extracted with EtOAc/ H₂O. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated.

Compound was obtained as a violet solid in 50% yield (80 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.75 (s, 2H, H₁, H₈); 3.86 (s, 6H, CH₃)

HPLC: $t_R = 7.36 \text{ min}$

MS (ESI)⁺: m/z 1002.6 [M+H]⁺

IX.1.d Eosin B etherification**4',5'-Dibromo-3',6'-dimethoxy-2',7'-dinitro-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-one****LSP9-1135**

Eosin B (580 mg, 1 mmol) was suspended in DMF (10 mL) with potassium carbonate (345 mg, 2.5 mmol) at 0 °C. Methyl iodide (426 mg, 3 mmol) was then added dropwise and stirred at room temperature 48 h. Residual methyl iodide was quenched by a mixture of ice/water and extracted with EtOAc/ H₂O. The organic layer was dried over MgSO₄, filtered and evaporated. The violet crude product was purified by PLC (silica gel 60 F254, 2 mm) with DCM/MeOH (90/10) as eluents.

Compound was obtained as a violet solid in 23% yield (140 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): 8.20 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H₄), 7.84 (m, 2H, H₅, H₆), 7.51 (d, *J* = 7.9Hz, 1H, H₇), 7.27 (s, 1H, H_{1'} or H_{8'}), 7.02 (s, 1H, H_{1'} or H_{8'}), 3.92 (s, 6H, CH₃)

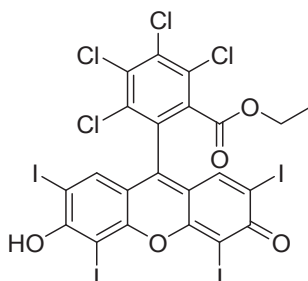
HPLC: *t_R* = 7.56 min

MS (ESI)⁺: *m/z* 609.4 [M+H]⁺

IX.1.e Rose Bengal esterification

Ethyl 4,5,6,7-tetrachloro-7a-(6'-hydroxy-2',4',5',7'-tetraiodo-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoate

LSP9-1037



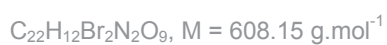
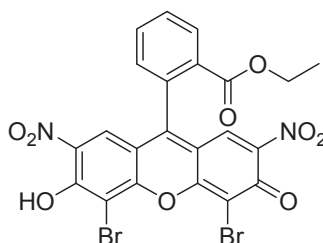
$C_{22}H_8Cl_4I_4O_5$, $M = 1001.75 \text{ g.mol}^{-1}$

Rose Bengal (100 mg, 0.1 mmol) was suspended in THF (10 mL). Ethylene bromide solution (0.22 mmol, 25 mg in 250 μL of THF) was then added as well as a DBU solution (0.18 mmol, 28 mg in 50 μL of THF). The solution was heated at 65 $^{\circ}\text{C}$ overnight. The mixture was extracted with DCM/ H_2O , the organic layer was dried and purified by extraction with aq. HCl / DCM.

Compound was obtained as a violet solid in 27% yield (276 mg)

HPLC: $t_R = 18.12 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 1000.6 $[\text{M-H}]^-$

IX.1.f Eosin B esterification**Ethyl 2-(2',7'-dibromo-6'-hydroxy-4'-5'-dinitro-3'-oxo-3H-xanthen-9'-yl)benzoate****LSP9-1138**

Eosin B (580 mg, 1 mmol) was suspended in THF (10 mL). Ethylene bromide (180 μL , 2.5 mmol) was then added as well as a DBU solution (372 μL , 2.5 mmol). The solution was heated at 65 $^{\circ}\text{C}$ for 48 hours. After cooling down to room temperature, the reaction mixture was extracted with EtOAc (2 x 100 mL). The organic layer was washed with two portions of brine and dried over anhydrous MgSO_4 . The solvent was evaporated at reduced pressure. The red crude product was purified by PLC (silica gel 60 F254, 2 mm) with DCM/MeOH (90/10) as eluent.

Compound was obtained as a red-violet solid in 23% yield (140 mg)

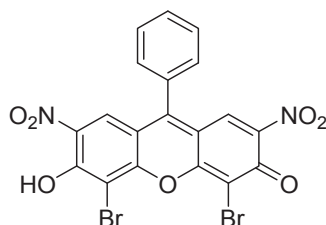
HPLC: $t_R = 3.27 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 606.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$

IX.1.g Eosin B decarboxylation

4,5-Dibromo-6-hydroxy-2,7-dinitro-9-phenyl-3H-xanthen-3-one

12 = LSP9-1136



$C_{19}H_{12}Br_2N_2O_7$, $M = 536.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Eosin B (580 mg, 1 mmol) was mixed with K_2CO_3 (345 mg, 2.5 mmol) and diluted in distilled DMSO/DMF (5/95) (20 mL) then Palladium(II) trifluoroacetate (166.23 mg, 0.5 mmol). TFA (600 μ L, 10 mmol) was added then reaction mixture was heated at 70°C for 72 h. Solvents were removed under reduced pressure. The violet crude product was purified by PLC (silica gel 60 F254, 2 mm) with DCM/MeOH (90/10) as eluent.

Compound was obtained as a violet solid in 14% yield (77 mg)

HPLC: $t_R = 4.3 \text{ min}$

MS (ESI)⁺: m/z 537.2 $[M+H]^+$

IX.2 Synthesis of Trypan Blue analogs

GENERAL PROCEDURE

General procedure D

Aminobenzoic acid (1 eq), EDC (1.4 eq), HOBt (1.2 eq) and DMAP (0.1 eq) were stirred under argon for 30 min then DMF (5 mL by mmol of reagent) was added. After 15 min methoxyethylamine or ethanolamine (1.5 eq) and Et₃N (3eq) were added. Reaction mixture was stirred under argon for 24-72 h at room temperature. Mixture was filtered then solvents were removed under reduced pressure.

The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc).

General procedure E

Pd₂(dba)₃ (0.03 eq) was mixed under argon atmosphere with KOAc (1 eq) and bis(pinacolato)diborane (1.1 eq) for 15 min. DMSO (3 mL by mmol of reagent) and iodoaniline (1eq) were added and warm to 80°C for 18 h. 40 mL of distilled water was added and product was extracted twice with toluene (2 x 20 mL). Organic layer was dried by MgSO₄. The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluted by DCM/cyclohexane: 95/5

General procedure F

Pd₂(OAc)₂ (0.03 eq) was mixed under argon atmosphere with KOAc (3 eq) and bis(pinacolato)diborane (1.1 eq) for 15 minutes. THF (10 mL by mmol of reagent) was added and mixture was heated at 85°C for 5 h. The second aniline (1 eq) was added with Cs₂CO₃ (1.5 eq) then Pd(PPh₃)₄ (0.03 eq). The mixture was heated at 85°C for 18 h. 25 mL of distilled and 25 mL of EtOAc was added then was filtered on celite. The crude product was purified by column chromatography on silica gel eluted by DCM/cyclohexane 95/5

General procedure G

Aniline or benzidine (1 eq) was stirred with water and/or EtOH (3 mL by mmol of reagent) at 0°C then HCl 37% (4 eq) was added then after 10 min, sodium nitrite in solid or in solution (H₂O/EtOH 1M) was added too. Reaction mixture was stirred at 0°C for 5 min and monitored by RMN ¹H.

Solvent was removed under reduced pressure.

General procedure H

Benzidine derivative (1 eq) was mixed under argon atmosphere then DCM (10 mL by mmol of reagent) was added. Boc₂O (1 eq) was added to the solution then DIEA (3 eq). Reaction mixture was stirred for 2 h then H₂O (20 mL by mmol of reagent) was added. Then product was extracted by EtOAc. Solent was removed under reduced pressure then was purified in column chromatography (EtOAc/Cyclohexane: 80/20).

General procedure I

MonoBoc benzidine derivative (1 eq) was dissolved in a Na₂CO₃ aqueous solution 10% (4 mL by mmol of reagent) and dioxane (4 mL by mmol of reagent) then Fmoc-Cl (1.1 eq) was added by portion. Reaction mixture was stirred at room temperature for 24 hours then H₂O (20 mL by mmol of reagent) was added.

Product was extracted by Et₂O (3 x 20 mL), organic layers were dried with MgSO₄ then product was concentrated in vacuum.

General procedure J

Prior to use:

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt was recrystallized three times from EtOH/H₂O-1/1 and addition of HCl to pH 3.

For monoazoic synthesis:

Aniline derivative (1 eq) was mixed with iced water and/or absolute EtOH (2 mL by mmol of reagent) and stirred at 0°C then hydrochloric acid 37% (4 eq) was added dropwise rapidly. Sodium nitrite (1.1eq or 1.3 eq aniline substituent depending) was added in solid or in solution (H₂O/EtOH 1M) below 2°C and reaction mixture was stirred at 0-2°C for 30 min.

Naphtalenesulfonique compound (0.9 eq) was dissolved in iced water (5 mL by mmol of reagent) then pH was adjusted to 9 by adding NaOH 30% solution.

The diazonium salt was coupled in alkaline media (pH 9) below 2°C by adding NaOH 10% solution. After complete addition of the diazonium salt to the 5-amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt, stirring was maintained at 0°C for 2 h. Product was extracted by EtOAc. Diazo compounds were recrystallized three times from EtOH/H₂O (1/1) and HCl 37% to pH 2. All organic impurities were then extracted by washing with small portion of Et₂O. The precipitated compounds were dried under vacuum.

For dioazoic synthesis

Benzidine derivative (1 eq) was mixed with iced water and/or absolute EtOH (2 mL by mmol of reagent) and stirred at 0°C then hydrochloric acid 37% (8 eq) was added dropwise rapidly. Sodium nitrite (2.2 eq or 2.6 eq aniline substituent depending) was added in solid or in solution (H₂O/EtOH 1M) below 2°C and reaction mixture was stirred at 0-2°C for 30 min.

Naphtalenesulfonique compound (1.8 eq) was dissolved in iced water (10 mL by mmol of reagent) then pH was adjusted to 9 by adding NaOH 30% solution.

The diazonium salt was coupled in alkaline media (pH 9) below 2°C by adding NaOH 10% solution. After complete addition of the diazonium salt to the 5-amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt, stirring was maintained at 0°C for 2 h. Product was extracted by EtOAc. Diazo compounds were recrystallized three times from EtOH/H₂O (1/1) and HCl 37% to pH 2. All organic impurities were then extracted by washing with small portion of Et₂O. The precipitated compounds were dried under vacuum.

General procedure J'

A contrario to general procedure J, pH was maintained to 4 during coupling

General procedure KPrior to use:

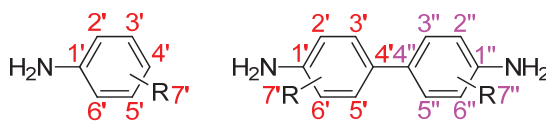
5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt was recrystallized three times from EtOH/H₂O-1/1 and addition of HCl to pH 3.

Benzamide derivative (1 eq) was mixed with iced water (10 mL by mmol of reagent) and stirred at 0°C then hydrochloric acid 37% (4 eq) was added dropwise rapidly. Sodium nitrite (1.1eq or 1.3 eq aniline substituent depending) was added in solid or in solution (H₂O/EtOH 1M) below 2°C and reaction mixture was stirred at 0-2°C for 30 min. Active carbon (200 mg by mmol of reagent) was slowly added with stirring during 30 min and the mixture was filtered while maintaining the temperature at 0-2°C.

Naphtalenesulfonique compound (0.9 eq) was dissolved in iced water (10 mL by mmol of reagent) then pH was adjusted to 9 by adding NaOH 30% solution.

The diazonium salt was coupled in alkaline media (pH 9) below 2°C by adding NaOH 10% solution. After complete addition of the diazonium salt to the 5-amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt, stirring was maintained at 0°C to room temperature for 12 h. Diazo compounds were recrystallized by adding NaOH aqueous solution 3%. The precipitate was filtered off and dried under vacuum. The residual solid was dissolved in EtOH (20 mL by mmol of reagent) and stirred under reflux for 2 h then was filtered hot and rinsed with hot EtOH. Solid was dry under reduced pressure.

IX.2.a Anilines and Benzidine synthesis

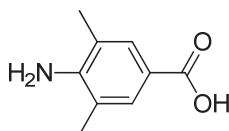


Atom numbering

IX.2.a.i Nitrobenzoic acid reduction

4-Amino-3,5-dimethylbenzoic acid

LSP9-1180



$C_9H_{11}NO_2$, $M = 165.19 \text{ g.mol}^{-1}$

Pathway A

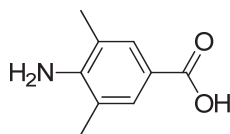
3,5-Dimethyl-4-nitrobenzoic acid (590 mg, 3 mmol) and tin(II) chloride (3519 mg, 15.6 mmol) was stirred under argon for 30 min before the addition of EtOAc (20 mL). The mixture was refluxed for 6.5 h and stirred overnight at room temperature. Saturated NaHCO_3 aqueous solution (75 mL) was added. The aqueous layer was washed twice by EtOAc (2 x 100mL). The aqueous layer was acidified to pH 3.5 by HCl (1M) and was extracted with EtOAc (3 x 150 mL). The organic layer was concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc : 100/0 to 0/100).

Compound was obtained as a yellow powder in 33 % yield (165 mg)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3CN): δ 8.93 (brs, 1H, OH); 7.58 (s, 2H, H_3 , H_5); 4.49 (brs, 2H, NH_2); 2.18 (s, 6H, H_7)

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3CN): δ 169.5 (C_8); 149.1 (C_1); 131.3 (C_3 , C_5); 122.8 (C_4); 121.6 (C_2 , C_6); 18.0 (C_7)

MS (ESI)^+ : m/z 166 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-3,5-dimethylbenzoic acid**LSP9-1180** $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$, $M = 165.19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ **Pathway B**

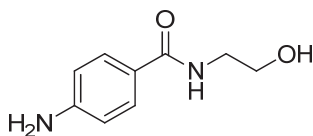
3,5-dimethyl-4-nitrobenzoic acid (976 mg, 5 mmol) was suspended in water (20 mL) under vigorously stirring for 30 min, until mixture was homogenized); Na_2CO_3 (300 mg, 2.8 mmol) and zinc dust (3 g, 30 mmol) were added to the solution then the mixture was heated at 30°C and HCl conc. (10 mL) was added dropwise over 20 min. Thereafter, the solution was filtered, and the filter cake was washed twice with water (2 x 7 mL). To remove unreacted 3,5-dimethyl-4-nitrobenzoic acid, the filtrate was washed twice with ethyl acetate (2 x 40 mL). The aqueous layer was adjusted to pH 9.35 by addition of saturated Na_2CO_3 solution (35 mL), and the precipitated ZnOH was filtered off. Once more, the filter cake was washed twice with 5% NaHCO_3 (2 x 10 mL). To remove by products, the filtrate was washed twice with EtOAc (2 x 80 mL). Subsequently, the aqueous layer was adjusted to pH 3.5 by addition of 1N HCl (~120 mL). Finally, the solution was extracted five times with ethyl acetate (5 x 80 mL). The combined organic layers were dried with MgSO_4 and evaporated dryness.

Compound was obtained as a clear brown solid in 76 % yield (629 mg)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 8.94 (brs, 1H, OH); 7.55 (s, 2H, H_3 , H_5); 4.52 (brs, 2H, NH_2); 2.15 (s, 6H, H_7)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ 168.5 (C_8); 149.9 (C_1); 131.0 (C_3 , C_5); 122.4 (C_4); 121.4 (C_2 , C_6); 17.9 (C_7)

MS (ESI) $^+$: m/z 166 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

IX.2.a.ii Synthesis of benzamide analogs**4-Amino-N-(2-hydroxyethyl)benzamide****LSP9-2016** $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$, $M = 180.20 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Pathway A

4-Aminobenzoic acid (185 mg, 1.35 mmol) was dissolved in DCM (20 mL) with PyBOP reagent (702.5 mg, 1.35 mmol). Reaction was cooled to 0°C then DIEA (240 μL , 1.35 mmol) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h then once again cooled to 0°C. A DCM solution (10 mL) of 2-methoxyethylamine (110 μL , 1.22 mmol) and DIEA (740 μL , 4.05 mmol,) prepared 1 h before was then added dropwise. The solution was allowed to warm and stirred overnight at room temperature.

Solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in EtOAc (80 mL). The organic layer was washed successively by using water (100 mL) and brine (2 x 50 mL), concentrated under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (EtOAc). Solvent was removed under reduced pressure.

Compound was obtained as a dark blue powder in 35 % yield (90 mg).

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.55 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 2H, H_2 , H_6); 6.76 (brs, 1H, NH); 6.63 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, H_3 , H_5); 4.53 (brs, 2H, NH_2); 3.40 (s, 4H, H_1' , H_1'' , H_2'' , H_2'''); 3.31 (s, 3H, H_7)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ 167.8 (C_7); 152.1 (C_4); 129.6 (C_2 , C_6); 123.9 (C_1); 114.3 (C_3 , C_5); 72 (C_2''); 58.9 (C_3''); 40 (C_1'')

MS (ESI) $^+$: m/z 194.9 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

Pathway B

Following the general procedure D,

4-aminobenzoic acid (960 mg; 7 mmol), EDC (1873 mg; 9.8 mmol), HOBT (1135 mg; 8.4 mmol), DMAP (86 mg; 0.7 mmol), 2-methoxyethylamine (914 μL ; 10.5 mmol), Et_3N (4.25 mL; 42 mmol)

Reaction time: 40 h

Compound was obtained as yellow oil in 92 % yield (1245 mg)

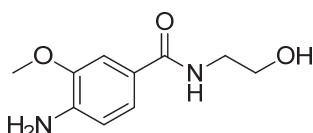
^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.63 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 2H, H_2 , H_6); 7.26 (brs, 1H, NH); 6.64 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 2H, H_3 , H_5); 4.79 (brs, 2H, NH_2); 3.49 (m, 4H, H_2'' , H_1''); 3.28 (s, 3H, H_3'')

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ 168.5 (C_7); 152.4 (C_4); 129.8 (C_2 , C_6); 123.6 (C_1); 114.5 (C_3 , C_5); 72 (C_2'); 58.9 (H_3'); 40.3 (C_1')

MS (ESI) $^+$: m/z 194.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-*N*-(2-hydroxyethyl)-3-methoxybenzamide

LSP9-2048



$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$, $M = 210.23 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-Amino-3-methoxybenzoic acid (668.7 mg; 4 mmol), EDC (1075 mg; 5.6 mmol), HOBt (649 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), ethanolamine (424 μL ; 6 mmol), Et_3N (1.66 mL; 12 mmol)

Reaction time: 40 h

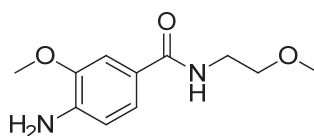
Compound was obtained as a white powder in 68 % yield (572 mg)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.48 (s, 1H, H_2); 7.44 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6.89 (brs, 1H, NH); 6.63 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 4.81 (brs, 2H, NH_2); 3.47 (brs, 2H, 2 x H_1'); 3.46 (br s, 2H, 2 x H_2'); 3.30 (s, 3H, H_7)

MS (ESI) $^+$: m/z 211.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-3-methoxy-*N*-(2-methoxyethyl)benzamide

LSP9-2059



$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$, $M = 224.26 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-Amino-3-methoxybenzoic acid (1003 mg; 6 mmol), EDC (1606 mg; 8.4 mmol), HOBt (973 mg; 7.2 mmol), DMAP (73 mg; 0.6 mmol), 2-methoxyethylamine (782 μL ; 9 mmol), Et_3N (5 mL; 36 mmol)

Reaction time: 72H

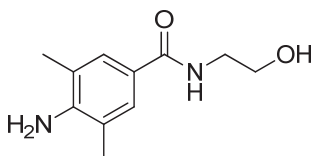
Compound was obtained as a beige-orange powder in 52 % yield (710 mg)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.27 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_2); 7.22 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6.83 (brs, 1H, NH); 6.67 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 4.45 (brs, 2H, NH_2); 3.86 (s, 3H, H_8); 3.47 (m, 4H, H_2' , H_1'); 3.31 (s, 3H, H_3')

MS (ESI)⁺: m/z 255 [M+H]⁺

4-Amino-N-(2-hydroxyethyl)-3,5-dimethylbenzamide

LSP9-2077



$C_{11}H_{16}N_2O_2$, $M = 208.26 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

LSP9-1180 (356 mg; 1.82 mmol), EDC (523 mg; 2.73 mmol), HOBT (344 mg; 2.55 mmol), DMAP (22 mg; 0.18 mmol), ethanolamine (150 μ L; 62.73 mmol), Et₃N (1.26 mL; 9 mmol)

Reaction time: 40 h

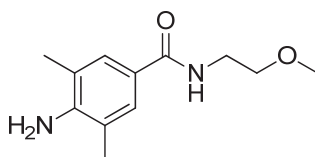
Compound was obtained as a white powder in 76 % yield (288 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.30 (s, 2H, H₃, H₅); 6.76 (brs, 1H, NH); 4.53 (brs, 2H, NH₂); 3.40 (s, 4H, H₁, H₂); 3.31 (s, 6H, H₇)

MS (ESI)⁺: m/z 209.4 [M+H]⁺

4-Amino-N-(2-methoxyethyl)-3,5-dimethylbenzamide

LSP9-2078



$C_{12}H_{18}N_2O_2$, $M = 222.28 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

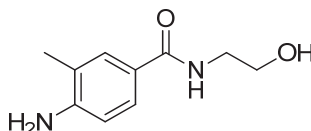
LSP9-1180 (354 mg; 2.14 mmol), EDC (615 mg; 3.2 mmol), HOBT (405.4 mg; 3 mmol), DMAP (25 mg; 0.2 mmol), 2-methoxyethylamine (280 μ L; 3.21 mmol), Et₃N (1.5 mL; 11 mmol)

Reaction time: 72H

Compound was obtained as a beige-orange powder in 40 % yield (410 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.30 (s, 2H, H₃, H₅); 6.76 (brs, 1H, NH); 4.53 (brs, 2H, NH₂); 3.40 (s, 4H, H₁, H₁', H₂', H₂''); 3.31 (s, 6H, H₇); 3.29 (s, 3H, H₃'')

MS (ESI)⁺: m/z 223.0 [M+H]⁺

4-Amino-N-(2-hydroxyethyl)-3-methylbenzamide**LSP9-2055**C₁₀H₁₄N₂O₂, M = 194.23 g.mol⁻¹

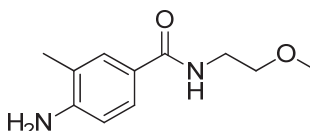
Following the general procedure D,

4-Amino-3-methylbenzoic acid (756 mg; 5 mmol), EDC (1342 mg; 7 mmol), HOBt (811 mg; 6 mmol), DMAP (61 mg; 0.5 mmol), ethanolamine (530 µL; 7.5 mmol), Et₃N (2.08 mL; 15 mmol)

Reaction time: 48 h

Compound was obtained as a white-beige powder in 99.8 % yield (970 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.49 (s, 1H, H₃); 7.44 (dd, *J* = 8.3 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, H₅); 6.90 (brs, 1H, NH); 6.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H₆); 4.42 (brs, 2H, NH₂); 3.60 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H₂); 3.41 (t, *J* = 5.5 Hz, 2H, H₁); 2.12 (s, 3H, H₇)

MS (ESI)⁺: m/z 194.9 [M+H]⁺**4-amino-N-(2-methoxyethyl)-3-methylbenzamide****LSP9-2052**C₁₁H₁₆N₂O₂, M = 208.26 g.mol⁻¹

Following the general procedure D,

4-Amino-3-methylbenzoic acid (605 mg; 4 mmol), EDC (1075 mg; 5.6 mmol), HOBt (649 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), 2-methoxyethylamine (522 µL; 6 mmol), Et₃N (1.67 mL; 12 mmol)

Reaction time: 48 h

Another batch of Et₃N (1.67 mL; 12 mmol) was added after 36 h

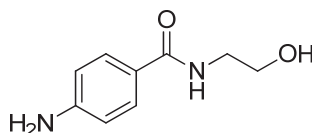
Compound was obtained as brown oil in 91 % yield (762 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.49 (s, 1H, H₂); 7.44 (dd, *J* = 8.2 Hz, *J* = 2.5 Hz, 1H, H₆); 6.99 (brs, 1H, NH); 6.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₅); 4.81 (brs, 2H, NH₂); 3.47 (s, 2H, H₁); 3.46 (s, 2H, H₂); 3.30 (s, 3H, H₃); 2.10 (s, 3H, H₈)

MS (ESI)⁺: m/z 208.9 [M+H]⁺

4-Amino-N-(2-hydroxyethyl)benzamide

LSP9-2060



$C_9H_{12}N_2O_2$, $M = 180.20 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-aminobenzoic acid (960 mg; 7 mmol), EDC (1873 mg; 9.8 mmol), HOBt (1135 mg; 8.4 mmol), DMAP (86 mg; 0.7 mmol), ethanolamine (583 μL ; 10.5 mmol), Et_3N (2.9 mL; 21 mmol)

Reaction time: 72 h

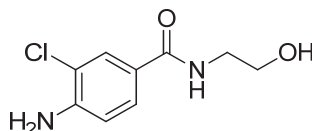
Compound was obtained as a beige powder in 99 % yield (1250 mg)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.57 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_2 , H_6); 6.90 (brs, 1H, NH); 6.63 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_3 , H_5); 4.56 (brs, 2H, NH_2); 3.60 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'}$); 3.40 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, $\text{H}_{1'}$)

MS (ESI) $^+$: m/z 180.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-3-chloro-N-(2-hydroxyethyl)benzamide

LSP9-2038



$C_9H_{11}\text{ClN}_2O_2$, $M = 214.65 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

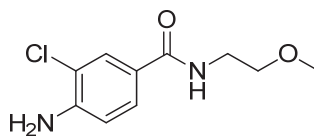
4-Amino-3chlorobenzoic acid (686.3 mg; 4 mmol), EDC (1075 mg; 5.6 mmol), HOBt (649 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), ethanolamine (424 μL ; 6 mmol), Et_3N (1.66 mL; 12 mmol)

Reaction time: 40 h

Compound was obtained as a white powder in 95 % yield (856.2 mg)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.72 (d, $J = 2$ Hz, 1H, H_2); 7.39 (dd, $J = 8.4$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H, H_6); 6.94 (brs, 1H, NH); 6.81 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_5); 4.87 (brs, 2H, NH_2); 3.61 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{1'}$); 3.40 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, $\text{H}_{2'}$)

MS (ESI) $^+$: m/z 214.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-3-chloro-*N*-(2-methoxyethyl)benzamide**LSP9-2039**

$C_{10}H_{13}ClN_2O_2$, $M = 228.68 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

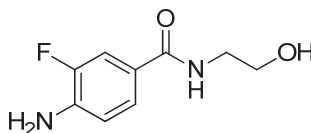
4-Amino-3chlorobenzoic acid (686.3 mg; 4 mmol), EDC (1075 mg; 5.6 mmol), HOBt (649 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), 2-methoxyethylamine (522 μ L; 6 mmol), Et₃N (2.77 mL; 20 mmol)

Reaction time: 40 h

Compound was obtained as a white powder in 87 % yield (800 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.72 (d, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H, H_{3'}); 7.55 (dd, $J = 8.5 \text{ Hz}$, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H, H_{5'}); 7.24 (brs, 1H, NH); 6.81 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, H_{6'}); 4.71 (brs, 2H, NH₂); 3.52 (brt, 4H, H_{1''}, H_{2''}); 3.25 (s, 3H, H_{3''})

MS (ESI)⁺: m/z 228.9 [M+H]⁺

4-Amino-3-fluoro-*N*-(2-hydroxyethyl)benzamide**LSP9-2031**

$C_9H_{11}FN_2O_2$, $M = 198.19 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-Amino-3-fluorobenzoic acid (620.5 mg; 4 mmol), EDC (1073.5 mg; 5.6 mmol), HOBt (648.6 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), Ethanolamine (333 μ L; 6 mmol), Et₃N (1.66 mL; 12 mmol)

Reaction time: 24 h

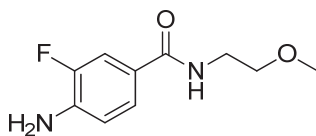
Compound was obtained as a brown solid in 92 % yield (730 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 7.45 (dd, $J = 12.7 \text{ Hz}$, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, H_{3'}); 7.42 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 2.3 \text{ Hz}$, 1H, H_{5'}); 6.92 (brs, 1H, NH); 6.77 (t, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H_{6'}); 4.93 (brs, 2H, NH₂); 3.66 (t, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 2H, H_{2''}); 3.44 (t, $J = 6.2 \text{ Hz}$, 2H, H_{1''})

MS (ESI): m/z 198.9 [M+H]⁺

4-Amino-3-fluoro-*N*-(2-methoxyethyl)benzamide

LSP9-2034



$C_{10}H_{13}FN_2O_2$, $M = 212.22 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-Amino-3-fluorobenzoic acid (620.5 mg; 4 mmol), EDC (1073.5 mg; 5.6 mmol), HOBt (648.6 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), 2-methoxyethylamine (522 μL ; 6 mmol), Et_3N (1.66 mL; 12 mmol), 20 mL DFMD

Reaction time: 48 h

Another batch of Et_3N (0.85 mL; 6 mmol) was added after 24 h

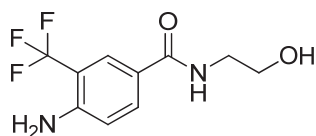
Compound was obtained as orange crystals in 92 % yield (780 mg)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3CN): δ 7.44 (dd, $J = 12.4 \text{ Hz}$, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.39 (dd, $J = 8.5 \text{ Hz}$, $J = 2.2 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 6.91 (brs, 1H, NH); 6.79 (t, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 4.81 (brs, 2H, NH_2); 3.46 (m, 4H, H_2 , H_1); 3.30 (s, 3H, H_3)

MS (ESI)^+ : m/z 212.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-*N*-(2-hydroxyethyl)-3-(trifluoromethyl)benzamide

LSP9-2069



$C_{10}H_{11}F_3N_2O_2$, $M = 248.20 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-amino-3-trifluoromethylbenzoic acid (411 mg; 2 mmol), EDC (536 mg; 2.8 mmol), HOBt (324 mg; 2.4 mmol), DMAP (25 mg; 0.2 mmol), ethanolamine (182 μL ; 3 mmol), Et_3N (0.85 mL; 6 mmol)

Reaction time: 72 h

Compound was obtained as a white powder in 80 % yield (400 mg)

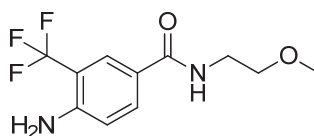
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3CN): δ 7.9 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_2); 7.75 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.2 (brs, 1H, NH); 6.82 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 4.23 (brs, 2H, NH_2); 3.62 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, H_2); 3.43 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, H_1)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ 167.6 (C_7); 149.3 (C_4); 133 (C_6); 127 (C_2); 123.8 (C_1); 118 (C_8); 117.4 (C_5); 62.1 (C_2'); 43.5 (C_1')

MS (ESI) $^+$: m/z 248.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-*N*-(2-methoxyethyl)-3-(trifluoromethyl)benzamide

LSP9-2070



$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$, $M = 262.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-amino-3-trifluoromethylbenzoic acid (411 mg; 2 mmol), EDC (536 mg; 2.8 mmol), HOBt (324 mg; 2.4 mmol), DMAP (25 mg; 0.2 mmol), 2-methoxyethylamine (260 μL ; 3 mmol), Et_3N (1.7 mL; 12 mmol)

Reaction time: 72 h

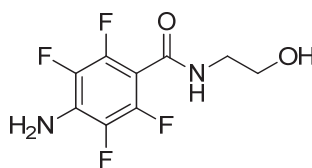
Compound was obtained as a white powder in 84 % yield (440 mg)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.87 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.73 (dd, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 6.96 (brs, 1H, NH); 6.82 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 5.05 (brs, 2H, NH_2); 3.47 (m, 4H, H_1' , H_2'); 3.3 (s, 3H, H_3')

MS (ESI) $^+$: m/z 262.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

4-Amino-2,3,5,6-tetrafluoro-*N*-(2-hydroxyethyl)benzamide

LSP9-2033



$\text{C}_9\text{H}_8\text{F}_4\text{N}_2\text{O}_2$, $M = 252.17 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure D,

4-Amino-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (836.5 mg; 4 mmol), EDC (1075 mg; 5.6 mmol), HOBt (649 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), Ethanolamine (333 μL ; 6 mmol), Et_3N (1.66 mL; 12 mmol)

Reaction time: 24 h

Compound was obtained as a white powder in 97 % yield (975 mg)

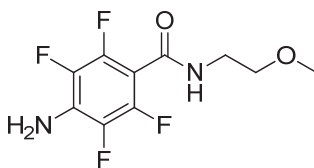
¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 6.94 (brs, 1H, NH); 4.90 (brs, 2H, NH₂); 3.59 (dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 2 Hz, 2H, H_{2'}); 3.42 (dd, *J* = 5.1 Hz, *J* = 2 Hz, 2H, H_{1'})

¹³C NMR (126 MHz, CD₃CN): δ 160.6 (C_{7'}); 146.6-144.7 (C_{2'}, C_{6'}); 138.5-136.5 (C_{3'}, C_{5'}); 130.56 (C_{4'}); 104.3 (C_{1'}); 61.8 (C_{2''}); 43.7 (C_{1''})

MS (ESI)⁺: *m/z* 252.9 [M+H]⁺

4-Amino-2,3,5,6-tetrafluoro-N-(2-methoxyethyl)benzamide

LSP9-2037



C₁₀H₁₀F₄N₂O₂, M = 266.19 g.mol⁻¹

Following the general procedure D,

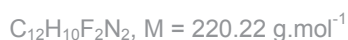
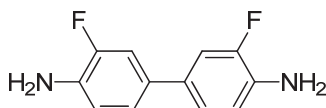
4-Amino-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (836.5 mg; 4 mmol), EDC (1075 mg; 5.6 mmol), HOBt (649 mg; 4.8 mmol), DMAP (49 mg; 0.4 mmol), 2-methoxyethylamine (522 μL; 6 mmol), Et₃N (2.51 mL; 18 mmol), 20 mL DFMD

Reaction time: 60H

Compound was obtained as a white powder in 93 % yield (990 mg)

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN): δ 6.92 (brs, 1H, NH); 4.90 (brs, 2H, NH₂); 3.49 (m, 4H, H_{1'}, H_{2'}); 3.32 (s, 3H, H_{3'})

MS (ESI)⁺: *m/z* 266.9 [M+H]⁺

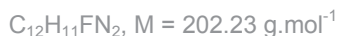
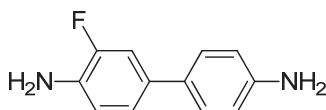
IX.2.a.iii Synthesis of benzidine analogs➤ Access to 3,3'-difluorobenzidine**3,3'-Difluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine****LSP9-3024**

NaOH (20 g, 0.5 mol) was dissolved in 60 mL of water. 4-Bromo-2-fluoroaniline (19 g, 0.1 mol), sodium formate (6.8 g, 0.1 mol), cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (4 g, 0.01 mol) and palladium on activated charcoal (2 g) were added to the solution. The reaction mixture was stirred under reflux for 4 h. Afterwards, another batch of sodium acetate (6.8 g, 0.1 mol), was added to the solution. The reaction mixture was heated under reflux for another 20 h. After cooling down to room temperature, the reaction mixture was filtered and the residual solid washed with EtOAc (500mL). This layer was filtered to remove salts. Solvents were removed under reduced pressure. The crude product was purified by column chromatography on silica gel (Cyclohexane/EtOAc: 70/30). The first eluted product was 3,3'-difluorobiphenyl-4,4'-diamine (LSP9-3024), followed by 2-fluorobenzidine (LSP9-3087) and benzidine (LSP9-3088)

Compound was obtained as an orange powder in 24 % yield (2.62 g)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.20 (dd, $J = 13 \text{ Hz}$, $J = 2 \text{ Hz}$, 2H, H_2 , H_2); 7.14 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 2 \text{ Hz}$, 2H, H_6 , H_6); 6.82 (t, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_5 , H_5); 4.19 (brs, 4H, 2 x NH_2)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ 152.7 (d, $J = 236.8 \text{ Hz}$, C_3 , C_3); 135.5 (d, $J = 13.4 \text{ Hz}$, C_4 , C_4); 130.9 (d, $J = 6.3 \text{ Hz}$, C_1 , C_1); 123.1 (d, $J = 2.4 \text{ Hz}$, C_6 , C_6); 117.9 (d, $J = 4.4 \text{ Hz}$, C_5 , C_5); 113.6 (d, $J = 19.5 \text{ Hz}$, C_2 , C_2)

3-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine**LSP9-3087**

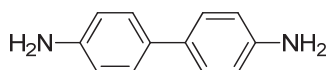
Compound was obtained as an orange powder in 16 % yield (1.78 g)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.29 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H_2 , H_6); 7.18 (dd, $J = 13 \text{ Hz}$, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H, H_2); 7.12 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 2 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6.82 (t, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 6.67 (t, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H_3 , H_5); 4.14 (brs, 4H, 2 x NH_2)

^{13}C NMR (126 MHz, CD_3CN): δ 152.7 (d, J = 235 Hz, C_3); 148 (C_4); 134.9 (d, J = 13.5 Hz, C_4); 132.4 (d, J = 6 Hz, C_1); 130.0 (C_1); 127.0 (C_2 - C_6); 122.9 (d, J = 2.3 Hz, C_6); 118.0 (d, J = 4.4 Hz, C_5); 115.0 (C_3 - C_5); 113.4 (d, J = 19.5 Hz, C_2)

Benzidine

LSP9-3088



$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2$, $M = 184.24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

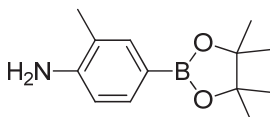
Compound was obtained as an orange powder in 10 % yield (1.12 g)

^1H NMR (500 MHz, CD_3CN): δ 7.31 (d, J = 8.2 Hz, 4H, H_2 , H_6 , H_2 , H_6); 6.62 (d, J = 8.2 Hz, 4H, H_3 , H_5 , H_3 , H_5); 4.09 (brs, 4H, 2 x NH_2)

➤ Organoborane synthesis

2-methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline

LSP9-1056



$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{BNO}_2$, $M = 233.11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure E,

$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (81 mg, 0.09 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (840 mg, 3.3 mmol), 4-iodo-2-methylaniline (700 mg, 3 mmol)

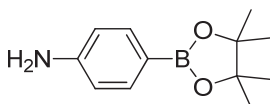
Compound was obtained as a white powder in 10 % yield (230 mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 6.87 (dd, 1H, J = 8.3 Hz, J = 3.1 Hz, H_5); 6.52 (d, 1H, J = 3.1 Hz, H_3); 6.36 (d, 1H, J = 8.3 Hz, H_6); 2.35 (s, 3H, H_7); 1.31 (s, 12H, H_8 - H_8 - H_9 - H_9)

MS (ESI) $^+$: m/z 234.0 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline

LSP9-1060



$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{BNO}_2$, $M = 219.09 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure E,

$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (81 mg, 0.09 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (840 mg, 3.3 mmol), 4-iodoaniline (660 mg, 3 mmol)

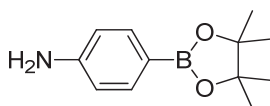
Compound was obtained as a white powder in 48 % yield (315 mg)

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 7.12 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_3 , H_5) ; 6.44 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, H_2 , H_6) ; 1.29 (s, 12H, H_8 - H_8' - H_9 - H_9')

MS (ESI)^+ : m/z 220.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

2-Fluoro-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline

LSP9-1078



$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{BFNO}_2$, $M = 237.08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure E,

$\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (81 mg, 0.09 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (840 mg, 3.3 mmol), 4-iodo-2-methylaniline (710 mg, 3 mmol)

Compound was obtained as a white powder in 53 % yield (377 mg)

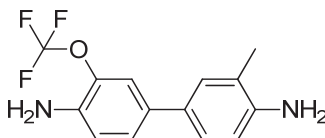
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{Me}_2\text{SO}-d_6$): δ 6.74 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 3.1$ Hz, H_5) ; 6.62 (d, 1H, $J = 3.1$ Hz, H_3) ; 6.4 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H_6) ; 1.33 (s, 12H, H_8 - H_8' - H_9 - H_9')

MS (ESI)^+ : m/z 238.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

➤ Suzuki-Miyaura coupling

3-methyl-3'-(trifluoromethoxy)-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine

LSP9-1106



$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}$, $M = 282.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

$\text{Pd}_2(\text{OAc})_2$ (7 mg, 0.03 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (280 mg, 1.1 mmol), 4-iodo-2-(trifluoromethoxy)aniline (303 mg, 1 mmol), 4-iodo-2-methylaniline (235 mg, 1 mmol), Cs_2CO_3 (490 mg, 1.5 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (35 mg, 0.03 mmol)

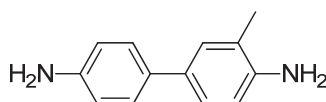
Compound was obtained as a white powder in 4 % yield (12 mg)

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.54 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H_2); 7.34 (dd, 1H, J = 8.2 Hz, J = 2.5 Hz, H_5); 7.22 (d, 1H, J = 2.1 Hz, H_2); 7.10 (dd, 1H, J = 8.1 Hz, J = 2.1 Hz, H_5); 6.58 (d, 1H, J = 8.2 Hz, H_6); 6.36 (d, 1H, J = 8.1 Hz, H_6); 2.35 (s, 3H, H_7)

MS (ESI) $^+$: m/z 283.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3-methyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine

LSP9-1058



$\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2$, $M = 198.26 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

$\text{Pd}_2(\text{OAc})_2$ (7 mg, 0.03 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (280 mg, 1.1 mmol), 4-iodolaniline (220 mg, 1 mmol), 4-iodo-2methylaniline (235 mg, 1 mmol), Cs_2CO_3 (490 mg, 1.5 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (35 mg, 0.03 mmol)

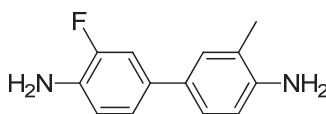
Compound was obtained as a white powder in 8 % yield (16 mg)

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.5 (m, 2H, H_2 , H_6); 7.4 (m, 1H, H_6); 7 (m, 1H, H_2); 6.6 (m, 2H, H_3 , H_5); 6.3 (m, 1H, H_5); 2.1 (s, 3H, H_7)

MS (ESI) $^+$: m/z 200.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$

3-fluoro-3'-methyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine

LSP9-1088



$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{FN}_2$, $M = 202.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

$\text{Pd}_2(\text{OAc})_2$ (7 mg, 0.03 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (280 mg, 1.1 mmol), 2-fluoro-4-iodoaniline (235 mg, 1 mmol), 4-iodolaniline (220 mg, 1 mmol), Cs_2CO_3 (490 mg, 1.5 mmol), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (35 mg, 0.03 mmol)

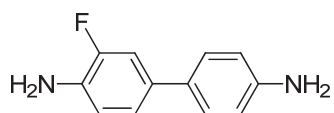
Compound was obtained as a white powder in 49 % yield (100 mg)

^1H NMR (500 MHz, MeOD): δ 7.5 (d, J = 3.2 Hz, 1H, H_2); 7.3 (m, 3H, H_2 , H_6 , H_6'); 6.5 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_5); 6.4 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_5); 2.2 (s, 3H, CH_7)

MS (ESI)⁺: m/z 203.4 [M+H]⁺

3-Fluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine

LSP9-1084



$C_{12}H_{11}FN_2$, $M = 202.23 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

$Pd_2(OAc)_2$ (7 mg, 0.03 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (280 mg, 1.1 mmol), 2-fluoro-4-iodoaniline (235 mg, 1 mmol), 4-iodo-2methylaniline (233 mg, 1 mmol), Cs_2CO_3 (490 mg, 1.5 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (35 mg, 0.03 mmol)

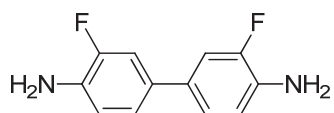
Compound was obtained as a white powder in 25 % yield (55 mg)

1H NMR (500 MHz, MeoD): δ 7,6 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7,5 (dd, $J = 7,9 \text{ Hz}$, $J = 2,9 \text{ Hz}$, 2H, H_2, H_6); 7,3 (dd, $J = 8 \text{ Hz}$, $J = 2,7 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6,9 (d, $J = 2,7 \text{ Hz}$, 1H, H_2); 6,5 (dd, $J = 7,9 \text{ Hz}$, $J = 2,9 \text{ Hz}$, 2H, H_3, H_5)

MS (ESI)⁺: m/z 203.0 [M+H]⁺

3,3'-difluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diamine

LSP9-1086



$C_{12}H_{10}F_2N_2$, $M = 220.22 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

$Pd_2(OAc)_2$ (7 mg, 0.03 mmol), KOAc (295 mg, 3 mmol), bis(pinacolato)diborane (280 mg, 1.1 mmol), 2-fluoro-4-iodoaniline (235 mg, 1 mmol), 2-fluoro-4-iodoaniline (235 mg, 1 mmol), Cs_2CO_3 (490 mg, 1.5 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (35 mg, 0.03 mmol)

Compound was obtained as a white powder in 80 % yield (176 mg)

1H NMR (500 MHz, MeoD): δ 7,3 (dd, $J = 8,1 \text{ Hz}$, $J = 3,1 \text{ Hz}$, 2H, H_6, H_6'); 6,8 (dd, $J = 8,1 \text{ Hz}$, $J = 3,1 \text{ Hz}$, 2H, H_2, H_2'); 6,6 (dd, $J = 8,1 \text{ Hz}$, $J = 3,1 \text{ Hz}$, 2H, H_5, H_5')

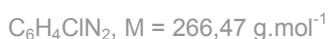
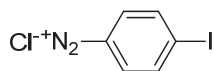
MS (ESI)⁺: m/z 221.4 [M+H]⁺

IX.2.b Diazotation

IX.2.b.i Diazotation of aniline and benzidine analogs

4-carboxybenzenediazonium chloride

LSP9-3027



Following the general procedure F,

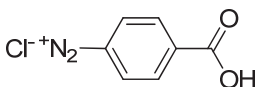
4-iodoaniline (1095 mg, 5 mmol), HCl 37% (1,67 mL, 20 mmol), NaNO_2 in solid (380 mg, 5.5 mmol), solvent H_2O

Compound was obtained as a white powder in 100 % yield (1330 mg)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ 8.81 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_2, H_6); 8.34 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_3, H_5)

4-carboxybenzenediazonium chloride

LSP9-2169



Following the general procedure F,

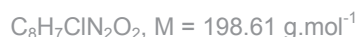
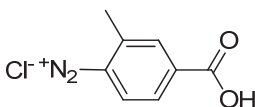
4-Aminobenzoic acid (685 mg, 5 mmol), HCl 37% (1,67 mL, 20 mmol), NaNO_2 in solid (380 mg, 5.5 mmol), solvent H_2O

Compound was obtained as a white powder in 100 % yield (925 mg)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ 8.87 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_2, H_6); 8.39 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_3, H_5)

4-carboxy-2-methylbenzenediazonium chloride

LSP9-3029



Following the general procedure F,

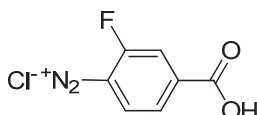
4-Amino-3-methylbenzoic acid (453 mg, 3 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO_2 in solution (227 mg, 2.3 mL), solvent $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$

Compound was obtained as a white powder in 100 % yield (595 mg)

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.69 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H_{6'}); 8.39 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H_{3'}); 8.31 (dd, J = 8.5 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H_{5'}); 2.87 (s, 3H, H₇)

4-carboxy-2-fluorobenzenediazonium chloride

LSP9-2174



$C_7H_4ClFN_2O_2$, $M = 202.54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

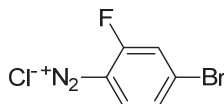
4-Amino-3-fluorobenzoic acid (620 mg, 4 mmol), HCl 37% (1.33 mL, 16 mmol), NaNO₂ in solid (303 mg, 4.4 mmol), solvent H₂O

Compound was obtained as a white powder in 95 % yield (770 mg)

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.74 (dd, J = 8.5 Hz, J = 5.6 Hz, 1H, H_{6'}); 8.32 (d, J = 9.8 Hz, 1H, H_{3'}); 8.25 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H_{5'})

4-bromo-2-fluorobenzenediazonium chloride

LSP9-3019



$C_6H_3BrClFN_2$, $M = 202.54 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure F,

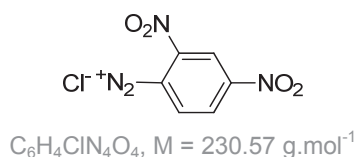
4-Bromo-2-fluoroaniline (760 mg, 4 mmol), HCl 37% (1.33 mL, 16 mmol), NaNO₂ in solution (3 mL, 3 mmol), solvent H₂O-EtOH

Compound was obtained as a white powder in 100 % yield (810 mg)

¹H-NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.62 (dd, J = 9 Hz, J = 6.3 Hz, 1H, H_{6'}); 8.35 (dd, J = 9 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H_{5'}); 8.08 (d, J = 9 Hz, 1H, H_{3'})

2,4-dinitrobenzenediazonium chloride

LSP9-3061



Following the general procedure F,

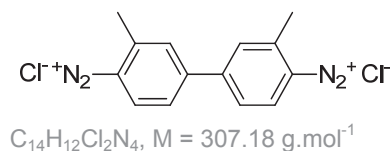
2,4-Dinitroaniline (366 mg, 2 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO_2 in solution (2.6 mL, 2.6 mmol), Solvent EtOH

Compound was obtained as a white powder in 100 % yield (460 mg)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ 9.61 (d, $J = 2.9 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 8.96 (dd, $J = 9.4 \text{ Hz}$, $J = 2.9 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.97 (d, $J = 9.4 \text{ Hz}$, 1H, H_6)

3,3'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-bis(diazonium)

LSP9-2178



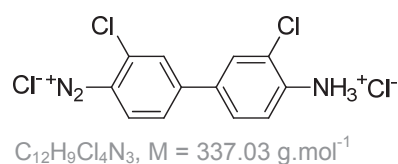
Reaction monitored by RMN ^1H for 1 h.

Tolidine (16 mg, 0.075 mmol) was stirred in MeOD (250 μL) then DCl (50 μL)(7.6 N) was added. NaNO_2 in solution at 1 M was added by portion of 0.2 eq.to 2.2 eq (18 mg, 0.26 mmol)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, MeOD): δ 8.83 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_6 - H_6'); 8.37 (s, 2H, H_3 - H_3'); 8.22 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_5 - H_5'); 2.94 (s, 6H, H_7 - H_7')

4'-Ammonio-3,3'-dichloro-[1,1'-biphenyl]-4-diazonium

LSP9-2155



Following the general procedure F,

3,3'-Dichlorobenzidine (489 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (0.5 mL, 6 mmol), NaNO_2 in solid (62 mg, 0.9 mmol), solvent H_2O

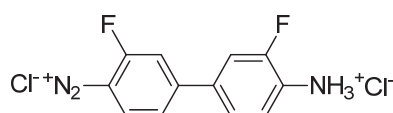
The crude product was concentrated in vacuo then extracted by adding 100 mL of HCL 1M solution to pH = 2 and EtOAc. The aqueous layer was evaporated.

Compound was obtained as a brown-orange powder in 45% yield (140 mg)

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.55 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{6'}); 8.26 (s, 1H, H_{3'}); 8.05 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}); 7.93 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H_{3''}); 7.70 (dd, J = 8.1 Hz, J = 1.3 Hz, 1H, H_{5''}); 7.08 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H_{6''})

4'-Ammonio-3,3'-difluoro-[1,1'-biphenyl]-4-diazonium

LSP9-3042



C₁₂H₉Cl₄F₂N₃, M = 304.12 g.mol⁻¹

Following the general procedure F,

LSP9-3024 (880 mg, 4 mmol), HCl 37% (1.33 mL, 16 mmol), NaNO₂ in solution (3.6 mL, 3.6 mmol), solvent EtOH

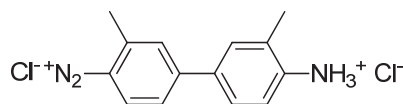
The crude product was concentrated in vacuo then extracted by adding 100 mL of HCL 1M solution to pH = 2 and EtOAc. The aqueous layer was evaporated.

Compound was obtained as an orange powder in 50 % yield (545 mg)

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.55 (dd, J = 9.1 Hz, J = 6.5 Hz 1H, H_{5'}); 8.15 (dd, J = 11.9 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, H_{3'}); 8.04 (dd, J = 9.1 Hz, J = 1.7 Hz, 1H, H_{6'}); 7.72 (m, 2H, H_{3''}-H_{5''}); 7.11 (t, J = 8.7 Hz, 1H, H_{6''});

3,3'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-bis(diazonium)

LSP9-2181



C₁₄H₁₅Cl₂N₃, M = 296,19 g.mol⁻¹

Following the general procedure F,

Tolidine (637 mg, 3 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO₂ in solid (166 mg, 2.4 mmol), solvent H₂O/EtOH

The crude product was concentrated in vacuo then extracted by adding 200 mL of HCL 1M solution to pH = 2 and EtOAc.

Aqueous layer was concentrated in vacuo.

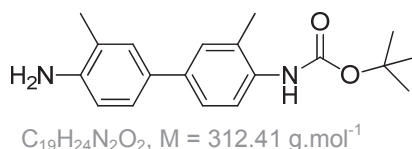
Compound was obtained as an orange powder in 41% yield (300 mg)

¹H NMR (500 MHz, MeOD): δ 8.59 (d, J = 8.8 Hz, 1H, H_{6'}); 8.15 (d, J = 1.2 Hz, 1H, H_{3'}); 8.07 (dd, J = 8.8 Hz, J = 1.2 Hz, 1H, H_{5'}); 7.84 (d, J = 1.8 Hz, 1H, H_{3''}); 7.79 (dd, J = 8.2 Hz, J = 1.8 Hz, 1H, H_{5''}); 7.37 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{6''}); 2.85 (s, 3H, H_{7'}); 2.45 (s, 3H, H_{7''})

IX.2.b.ii BOC Monoprotection

***tert*-Butyl (4'-amino-3,3'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate**

LSP9-1157



Following the general procedure G,

Tolidine (424 mg, 2 mmol), Boc_2O (436 mg, 2 mmol), DIEA (1.01 mL, 6 mmol).

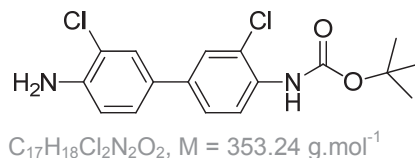
Compound was obtained as a white powder in 40% yield (250 mg)

^1H NMR (250 MHz, CD_3CN): δ 7.20 (s, 2H, H_3, H_3'); 7.16 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, H_5, H_5'); 6.65 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, H_6, H_6'); 3.98 (brs, 2H, NH_2); 2.25 (s, 3H, H_7); 2.15 (s, 3H, H_7'); 1.50 (s, 9H, H_8)

MS (ESI) $^+$: m/z 313.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$

***tert*-Butyl (4'-amino-3,3'-dichloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate**

LSP9-1160



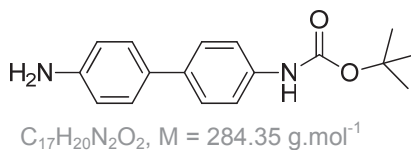
Following the general procedure G,

Tolidine (424 mg, 2 mmol), Boc_2O (436 mg, 2 mmol), DIEA (1.01 mL, 6 mmol).

Compound was obtained as a white powder in 30 % yield (212 mg)

^1H NMR (250 MHz, CD_3CN): δ 7.99 (s, 1H, H_3); 7.78 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_5); δ 7.69 (s, 1H, H_3'); 7.60 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.35 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_5'); 7.15 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6'); 4.02 (brs, 2H, NH_2); 1.51 (s, 9H, H_8)

MS (ESI) $^+$: m/z 354.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$

tert*-Butyl (4'-amino-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate*LSP9-1162**

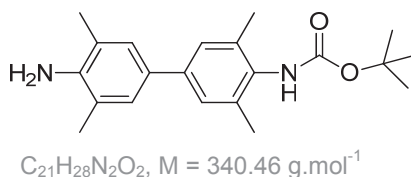
Following the general procedure G,

Benzidine (978 mg, 3 mmol), Boc_2O (654 mg, 3 mmol), DIEA (1.5 mL, 9 mmol).

Compound was obtained as a white powder in 45 % yield (380 mg)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CD_3CN): δ 7.82 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H_2' , H_6'); 7.75 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 2H, H_3' , H_5'); 7.59 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, H_3 , H_5); 7.01 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 2H, H_2 , H_6); 3.95 (brs, 2H, NH_2); 1.51 (s, 9H, H_8)

MS (ESI)^+ : m/z 284.4 $[\text{M}+\text{H}]^+$

tert*-Butyl (4'-amino-3,3',5,5'-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate*LSP9-1167**

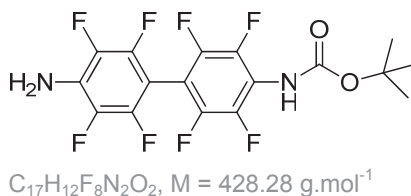
Following the general procedure G,

3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (520 mg, 2.16 mmol), Boc_2O (472 mg, 2.16 mmol), DIEA (1.1 mL, 6.5 mmol).

Compound was obtained as a white powder in 23 % yield (170 mg)

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CD_3CN): δ 7.61 (s, 2H, H_3' , H_5'); 7.40 (s, 2H, H_3 , H_5); 4.31 (brs, 2H, NH_2); 1.51 (s, 12H, H_7 , H_7'); 1.46 (s, 9H, H_8)

MS (ESI)^+ : m/z 341.6 $[\text{M}+\text{H}]^+$

tert*-Butyl (4'-amino-2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate*LSP9-1172**

Following the general procedure G,

4,4'-Diaminooctafluorobenzidine (984 mg, 3 mmol), Boc₂O (654 mg, 3 mmol), DIEA (1.5 mL, 9 mmol).

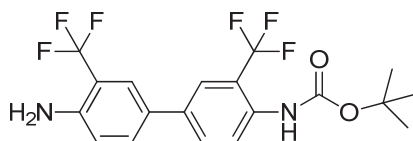
Compound was obtained as a white powder in 35 % yield (450 mg)

¹H NMR (250 MHz, CD₃CN): δ 4.42 (brs, 2H, NH₂); 1.53 (s, 9H, H₈)

MS (ESI)⁺: m/z 429.1 [M+H]⁺

***tert*-Butyl (4'-amino-3,3'-bis(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate**

LSP9-1175



C₁₉H₁₈F₆N₂O₂, M = 420.35 g.mol⁻¹

Following the general procedure G,

3,3'-Bis(trifluoromethyl)benzidine (960 mg, 3 mmol), BOC₂O (654 mg, 3 mmol), DIEA (1.5 mL, 9 mmol).

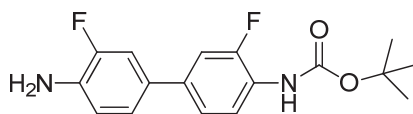
Compound was obtained as a white powder in 25 % yield (315 mg)

¹H NMR (250 MHz, CD₃CN): δ 8.21 (s, 1H, H_{3'}); 7.82 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}); δ 7.80 (s, 1H, H₃); 7.78 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{6''}); 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}); 7.22 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{6'}); 4.10 (brs, 2H, NH₂); 1.55 (s, 9H, H₈)

MS (ESI)⁺: m/z 421.0 [M+H]⁺

***tert*-Butyl (4'-amino-3,3'-difluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)carbamate**

LSP9-1176



C₁₇H₁₈F₂N₂O₂, M = 320.33 g.mol⁻¹

Following the general procedure G,

3,3'-Difluorobenzidine (280 mg, 1.3 mmol), BOC₂O (283mg, 1.3 mmol), DIEA (0.65mL, 4 mmol).

Compound was obtained as a white powder in 25 % yield (105 mg)

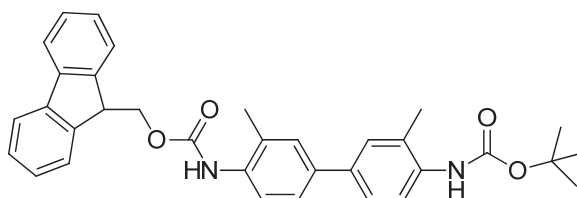
¹H NMR (250 MHz, CD₃CN): δ 8.10 (s, 1H, H_{3'}); 7.72 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{5'}); δ 7.69 (s, 1H, H₃); 7.58 (d, J = 8.2 Hz, 1H, H_{6''}); 7.47 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{5''}); 7.12 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H_{6'}); 4.05 (brs, 2H, NH₂); 1.53 (s, 9H, H₈)

MS (ESI)⁺: m/z 321.6 [M+H]⁺

IX.2.b.iii Fmoc Protection

(9H-Fluoren-9-yl)methyl tert-butyl (3,3'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)dicarbamate

LSP9-1159



C₃₄H₂₄N₂O₄, M = 534.64 g.mol⁻¹

Following the general procedure I,

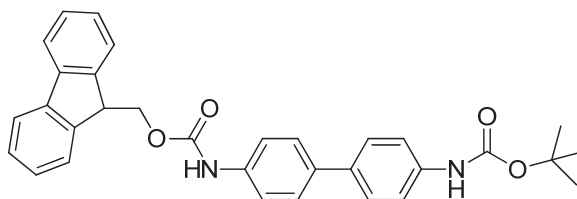
LSP9-1160 (225 mg, 0.72 mmol), Fmoc-Cl (207 mg, 0.8 mmol)

Compound was obtained as a white powder in 68 % yield (260 mg)

¹H NMR (250 MHz, MeOD): δ 7.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.55 (s, 1H, H_{3'}); 7.50 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{6'}); 7.44 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H_{5'}); 7.39 (t, *J* = 6 Hz, 4H, H_{Fmoc} + H_{tolidine}); 7.30 (t, *J* = 6 Hz, 3H, H_{Fmoc}); 4.50 (d, *J* = 12 Hz, 2H, H_{Fmoc}); 4.41 (m, 1H, H_{Fmoc}); 2.42 (s, 3H, H_{7'}); 2.27 (s, 3H, H_{7''}); 1.55 (s, 9H, H_{8'})

(9H-Fluoren-9-yl)methyl tert-butyl [1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl dicarbamate

LSP9-1175



C₃₂H₃₀N₂O₄, M = 506.59 g.mol⁻¹

Following the general procedure I,

LSP9-1162 (310 mg, 1.1 mmol), Fmoc-Cl (313 mg, 1.21 mmol),

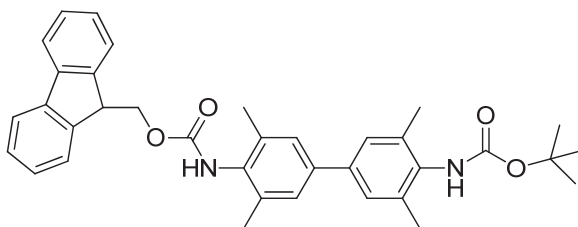
Compound was obtained as a white powder in 51 % yield (285 mg)

¹H NMR (250 MHz, MeOD): δ 7.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{2''}, H_{6''}); 7.79 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}); 7.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, H_{3'}, H_{5'}); 7.39 (t, *J* = 6 Hz, 2H,

H_{Fmoc}); 7.30 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H_{Fmoc}); 6.99 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_2' , H_6'); 4.49 (s, 2H, H_{Fmoc}); 4.37 (m, 1H, H_{Fmoc}); 1.45 (s, 9H, H_8')

(9H-Fluoren-9-yl)methyl tert-butyl (3,3',5,5'-tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)dicarbamate

LSP9-1178

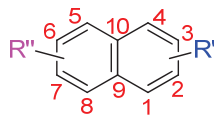


$\text{C}_{36}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4$, $M = 562.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Following the general procedure I,
LSP9-1167 (170 mg, 0.5 mmol), Fmoc-Cl (142 mg, 0.55 mmol)

Compound was obtained as a white powder in 99 % yield (278mg)

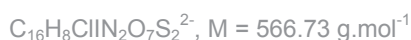
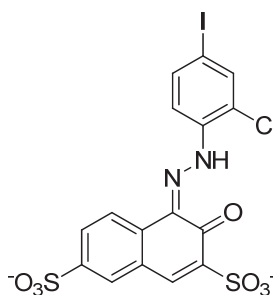
^1H NMR (250 MHz, MeOD): δ 7.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.60 (s, 2H, $H_{3''}$ - $H_{3''}$); 7.42 (s, 2H, $H_{3''}$ - $H_{3''}$); 7.41 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H_{Fmoc}); 7.29 (t, $J = 6$ Hz, 2H, H_{Fmoc}); 4.51 (s, 2H, H_{Fmoc}); 4.42 (m, 1H, H_{Fmoc}); 1.52 (s, 12H, $H_{7''}$ - $H_{7''}$); 1.45 (s, 9H, H_8')

IX.2.c Azoic coupling


Atom numbering

 IX.2.c.i Azoic dyes

(Z)-4-(2-(2-Chloro-4-iodophenyl)hydrazono)-3-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate

LSP9-3077


Following the general procedure J,

2-Chloro-4-iodoaniline (508 mg, 2 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO₂ in solid (180 mg, 2.6 mmol), solvent H₂O

2-Naphtol-3,6-disulfonic acid (488 mg, 1.4 mmol)

Compound was obtained as an orange-red powder in 75 % yield (594 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.40 (s, 1H, NH); 8.42 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H₅); 8.31 (s, 1H, H₁); 8.04 (s, 1H, H₃); 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₅); 7.96 (s, 1H, H₈); 7.86 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₆); 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H₆)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 172.9 (C₄); 147.1 (C₇); 141.1 (C₂); 139.6 (C₁); 139.5 (C₁); 137.5 (C₃, C₆); 132.8 (C₉); 131.1 (C₄); 127.5 (C₆); 126.6 (C₈); 125.92 (C₁₀); 123.8 (C₂); 121.5 (C₅); 118.7 (C₅); 91.2 (C₄)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + 2 Na⁺; + H₂O):

C 27.88 (27.78); H 1.52 (1.46); N 4.06 (4.15); S 9.16 (9.31)

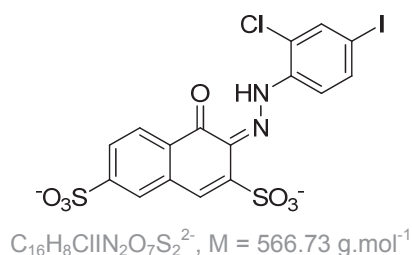
HPLC: *t_R* = 9.87 min

MS (ESI)⁺: *m/z* 567.1 [M+H]⁺

UV vis λ_{max} = 493 nm

(E)-3-(2-(2-Chloro-4-iodophenyl)hydrazono)-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate

LSP9-3078



Following the general procedure J,

2-Chloro-4-iodoaniline (508 mg, 2 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO_2 in solid (180 mg, 2.6 mmol), solvent H_2O

1-naphthol-3,6-disulfonic acid (488 mg, 1.4 mmol)

Compound was obtained as a red powder in 40 % yield (321 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.12 (s, 1H, NH); 8.26 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 8.00 (d, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.89 (d, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.88 (dd, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.87 (d, $J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H_8); 7.75 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.59 (s, 1H, H_1)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 176.9 (C_4); 152.9 (C_7); 143.5 (C_2); 139.2 (C_2); 137.4 (C_6); 137.2 (C_3); 135.4 (C_{10}); 130.3 (C_3); 129.8 (C_9); 126.9 (C_5); 125.5 (C_8); 125.1 (C_6); 122.3 (C_1); 121.9 (C_1); 119.3 (C_5); 90.2 (C_4)

Elemental analysis found (calc.) (+ 2 Na^+ ; + 2 H_2O):

C 29.65 (29.62); H 1.90 (1.86); N 4.43 (4.32); S 10.02 (9.89)

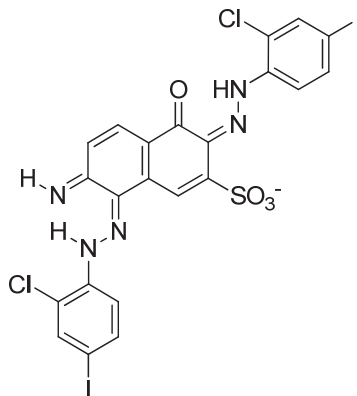
HPLC: $t_R = 10.53 \text{ min}$

MS (ESI) $^+$: m/z 567.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

UV vis λ_{max} : 500 nm

(3E,8Z)-3,8-Bis(2-(2-chloro-4-iodophenyl)hydrazono)-7-imino-4-oxo-3,4,7,8-tetrahydronaphthalene-2-sulfonate

LSP9-3080



$C_{22}H_{12}Cl_2I_2N_5O_4S^-$, $M = 767.14 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure J,

2-Chloro-4-iodoaniline (508 mg, 2 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO_2 in solid (180 mg, 2.6 mmol), solvent H_2O

7-Amino-4-hydroxy-2-naphthalendisulfonic acid (335 mg, 1.4 mmol)

Compound was obtained as a dark blue powder in 42 % (345 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.36 (s, 1H, NH); 9.96 (s, 1H, NH); 8.65 (s, 1H, H_1); 8.14 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 8.12 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_3'); 7.97 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.94 (dd, $J = 8.3 \text{ Hz}$, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H_5'); 7.84 (m, 2H, H_5 - H_6); 7.59 (d, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.05 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 1H, H_6)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 174.6 (C_4); 147.6 (C_2'); 146.2 (C_7); 144.8 (C_2); 139.6 (C_2'); 139.2 (C_8); 138.2 (C_3'); 137.2 (C_3' , C_5' , C_5''); 133.4 (C_1'); 131.7 (C_5); 130.1 (C_3); 128.6 (C_{10}); 122.4 (C_1'); 120.0 (C_9); 119.1 (C_6'); 118.2 (C_6); 117.7 (C_6'); 117.2 (C_1); 96.9 (C_4'); 89.8 (C_4'')

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + Na^+ ; + 2 H_2O):

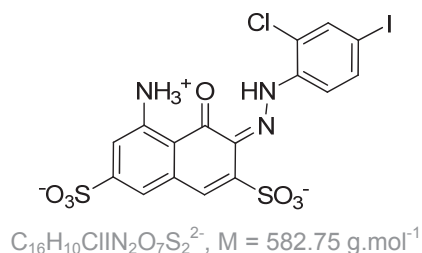
C 29.92 (29.87); H 1.83 (1.82); N 8.01(7.92); S 3.74 (3.62)

HPLC $t_R = 20.61 \text{ min}$

MS (ESI) $^-$: m/z 766.2 [M-H] $^-$

(E)-5-Ammonio-3-(2-(2-chloro-4-iodophenyl)hydrazono)-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate

LSP9-2179



Following the general procedure J,

2-Chloro-4-iodoaniline (508 mg, 2 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO_2 in solid (180 mg, 2.6 mmol), solvent H_2O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (359 mg, 1.2 mmol)

Compound was obtained as a dark blue powder in 6 % yield (37 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.47 (s, 1H, NH); 7.90 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_3); 7.83 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_6); 7.76 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H, H_5); 7.33 (s, 1H, H_1); 7.10 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H_6); 6.88 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.9 (C_4); 153.9 (C_7); 153.5 (C_2); 142.5 (C_5); 139.3 (C_1); 137.1 (C_3); 136.8 (C_9); 136.1 (C_5); 130.8 (C_3); 124.3 (C_1); 120.4 (C_2); 118.6 (C_6); 113.9 (C_8); 112.8 (C_6); 111.2 (C_{10}); 87.0 (C_4)

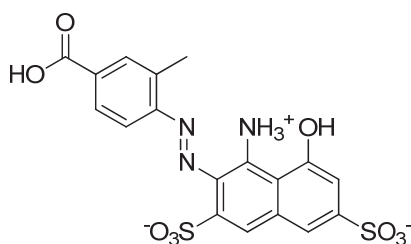
Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + 4 H_2O):

C 28.20 (28.35); H 2.64 (2.68); N 5.08 (6.20); S 9.96 (9.46)

HPLC $t_R = 12.12$ min

MS (ESI): m/z 581.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 527$ nm

(E)-4-Ammonio-3-((4-carboxy-2-methylphenyl)diazenyl)-5-hydroxy-7-sulfonatophthalen-2-yl sulfite**LSP9-3030**

Following the general procedure J',

4-Amino-3-methylbenzoic acid (453 mg, 3 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO₂ in solution (3.3 mL, 3.3 mmol), solvent H₂O/EtOH

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (445 mg, 1.4 mmol) in 10 mL of H₂O.

Compound was obtained as a dark blue powder in 16 % (110 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 14.30 (brs, 1H, NH); 10.39 (brs, 1H, OH); 8.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₅); 7.85 (s, 1H, H₃); 8.84 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, H₆); 7.50 (s, 1H, H₁); 7.40 (s, 1H, H₈); 7.36 (s, 1H, H₈); 2.45 (s, 3H, H₇)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + 3 H₃O⁺; + H₂O):
C 37.12 (37.54); H 3.34 (3.33); N 7.15 (7.30); S 10.87 (11.14)

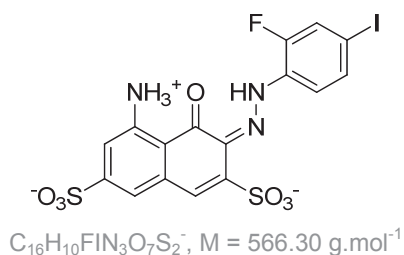
HPLC *t_R* = 8.83 min

MS (ESI)⁺: *m/z* 479.5 [M-H]⁺

IX.2.c.ii Mono and disazoic dyes

(E)-4-Ammonio-6-(2-(2-fluoro-4-iodophenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2126



Following the general procedure J,

2-Fluoro-4-iodoaniline (593 mg, 2.5 mmol), HCl 37% (0.8 mL, 10 mmol), NaNO₂ in solid (190 mg, 2.75 mmol), solvent H₂O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (445 mg, 1.4 mmol)

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound LSP9-2126 was the first eluted and obtained as a violet powder in 3 % yield (25 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.36 (s, 1H, NH); 7.76 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 1H, H_{6'}); 7.75 (dd, $J = 10.3 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_{3'}); 7.64 (dd, $J = 8.5 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_{5'}); 7.29 (s, 1H, H_{1'}); 7.08 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H₆); 6.84 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H₈)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 180.3 (C₄); 159.2 (C_{2'}); 154.1 (C₇); 152.9 (C₂); 142.5 (C₅); 137.1 (C₉); 131.5 (C_{1'}); 130.9 (C₃); 125.5 (C_{3'}); 125.3 (C₁); 121.4 (C_{6'}); 120.5 (C_{5'}); 113.8 (C₈); 112.9 (C₆); 111.2 (C₁₀); 85.1 (C_{4'})

Elemental analysis found (calc.) (+ Na⁺; + 4 H₂O):

C 37.55 (37.57); H 2.80 (2.78); N 7.77 (7.73); S 11.22 (11.80)

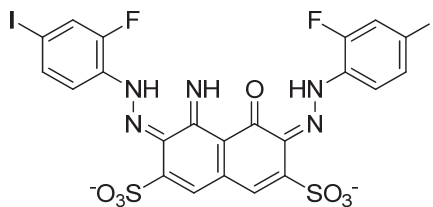
HPLC $t_R = 10.61 \text{ min}$

MS (ESI)⁻: m/z 565.9 [M-H]⁻

UV vis $\lambda_{max} = 536 \text{ nm}$

(3*E*,6*E*)-3,6-Bis(2-(2-fluoro-4-iodophenyl)hydrazono)-4-imino-5-oxo-7-sulfonato-3,4,5,6-tetrahydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3083



Compound LSP9-3083 was the second eluted and obtained as a blue powder in 5 % yield (42 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.53 (s, 1H, NH); 10.30 (s, 1H, NH); 7.90 (dd, $J = 10 \text{ Hz}$, $J = 1.6 \text{ Hz}$, 1H, H_{3^*}); 7.85 (dd, $J = 10.4 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_{3^*}); 7.81 (t, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 1H, H_{6^*}); 7.80 (t, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_{6^*}); 7.73 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_{5^*}); 7.70 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_{5^*}); 7.47 (s, 1H, H_6); 7.41 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 180.7; 169.2; 154.7; 146.4; 145.3; 140.6; 140.3; 134.5; 134.0; 130.5; 129.0; 125.4; 124.5; 123.4; 122.5; 120.0; 119.1; 117.1; 115.0; 109.7; 96.2

Elemental analysis found (calc.) (+NaCl; + 2 Na^+ ; + H_2O):

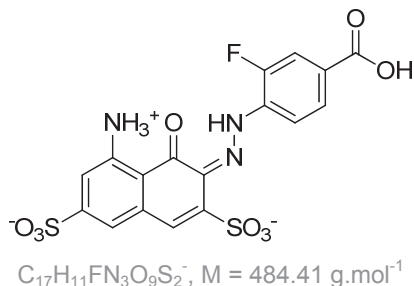
C 28.17 (28.24); H 1.42 (1.40); N 7.60 (7.48); S 6.65 (6.85)

HPLC $t_R = 14.11 \text{ min}$

MS (ESI) $^-$: m/z 813.8 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxy-2-fluorophenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite
LSP9-2135



Following the general procedure J,

4-Amino-3-fluorobenzoic acid (388 mg, 2.5 mmol), (0.8 mL, 10 mmol), NaNO_2 in solid (190 mg, 2.75 mmol), Solvent H_2O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (445 mg, 1.4 mmol)

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound LSP9-2135 was the first eluted and obtained as a violet powder in 12 % yield (80 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.38 (s, 1H, NH); 8.02 (t, $J = 8.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.80 (dd, $J_1 = 8.3 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.75 (dd, $J_1 = 11.8 \text{ Hz}$, $J_2 = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.33 (s, 1H, H_1); 7.10 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6.87 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 182.3 (C_4); 166.7 (C_7); 153.9 (C_7); 153.8 (C_2); 149.2 (C_2'); 148.1 (C_4'); 142.5 (C_5); 136.2 (C_9); 131.4 (C_3); 126.7 (C_5'); 124.8 (C_1); 116.4 (C_6'); 116.2 (C_3'); 114.2 (C_8); 113.1 (C_6); 111.4 (C_{10})

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; +Na⁺; + 3 H₃O⁺):
 C 33.99 (34.05); H 3.80 (3.65); N 6.79 (6.62); S 10.15 (10.10)

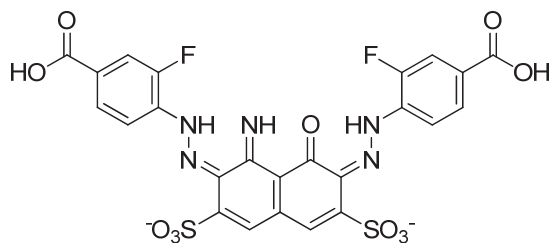
HPLC $t_R = 8.77 \text{ min}$

MS (ESI)⁻: m/z 484.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$

(3*E*,6*E*)-3,6-Bis(2-(4-carboxy-2-fluorophenyl)hydrazono)-4-imino-5-oxo-7-sulfonato-3,4,5,6-tetrahydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3084



Compound LSP9-3084 was the second eluted and obtained as a blue powder in 14 % yield (131 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.65 (s, 1H, NH); 10.30 (s, 1H, NH); 8.02 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6); 7.97 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_6); 7.75 (m, 4H, H_3 ; H_5 ; H_3 ; H_5); 7.48 (s, 1H, H_1); 7.42 (s, 1H, H_8)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + 2 Na^+ ; + 2 H_2O):
C 36.51 (36.49); H 2.21 (2.17); N 8.68 (8.87); S 8.34 (8.12)

HPLC $t_R = 12.45$ min

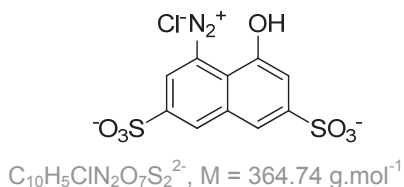
MS (ESI): m/z 650.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 606$ nm

IX.2.c.iii Cresol coupling with diazonium salt of 5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid

4-Diazonium-5-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic chloride

LSP9-3053



Following the general procedure G,

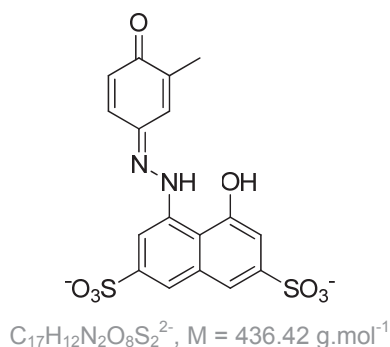
5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (478 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (0.5 mL, 6 mmol), NaNO_2 in solution (1.95 mL, 1.95 mmol).

Compound was obtained as a yellow powder in 100 % yield (547 mg)

^1H NMR (250 MHz, MeOD): δ 8,04 (s, 1H, H_1); 7,70 (s, 1H, H_8); 7,69 (s, 1H, H_3); 7,30 (s, 1H, H_6)

(Z)-4-Hydroxy-5-(2-(3-methyl-4-oxocyclohexa-2,5-dien-1-ylidene)hydrazinyl)naphthalene-2,7-disulfonate

LSP9-3055



Cresol (194 mg, 1.8 mmol, 0.186 mL) was stirred with iced H_2O (10 mL) then pH was adjusted to 10.

LSP9-3053 (547 mg, 1.5 mmol) was solubilized in iced H_2O (10 mL) and iced EtOH (5 mL). This solution was added dropwise to a cresol solution.

The cresol was coupled in alkaline media (pH 11) below 2°C by adding aqueous NaOH 10% solution. After addition of the diazonium salt, the reaction was maintained at 0°C for 2 h. Diazo compounds were recrystallized three times from EtOH/ H_2O (1/1) and HCl 37% to pH 2. All organic impurities were then extracted by washing the precipitate with small portion of Et_2O and dried under vacuum. Purification was performed by preparative HPLC gradient P3

Compound was obtained as an orange powder in 21 % yield (136 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 13.39 (s, 1H, NH); 8.01 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H_1); 7.86 (s, 1H, H_8); 7.53 (d, J = 2.6 Hz, 1H, H_2); 7.51 (s, 1H, H_6); 7.50 (dd, J = 9.1 Hz, J = 2.6 Hz, 1H, H_6); 7.00 (d, J = 1.3 Hz, 1H, H_3); 6.43 (d, J = 9.1 Hz, 1H, H_5); 2.06 (s, 3H, H_7)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 172.9 (C_4'); 156.3 (C_4); 149.2 (C_2); 147.1 (C_5); 146.3 (C_9); 139.6 ($\text{C}_{1'}$); 134.4 (C_7); 128.6 (C_6'); 124.9 (C_2'); 123.3 (C_8); 119.1 (C_5'); 117.2 (C_{10}); 115.1 (C_6); 108.1 (C_3); 107.1 (C_1); 16.8 (C_7')

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + 2 Na^+ ; + 3 H_2O):
C 34.35 (34.32); H 3.03 (3.05); N 4.82 (4.71); S 10.52 (10.78)

HPLC t_R = 9.24 min

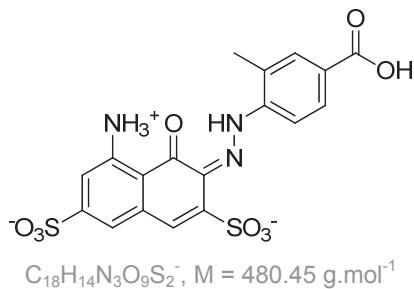
UV vis λ_{max} = 492 nm

MS (ESI) $^+$: m/z 436.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IX.2.c.iv Monazoic dyes: carboxylic acid and halogen series

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxy-2-methylphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2129



Following the general procedure J,

4-Amino-3-methylbenzoic acid (378 mg, 2.5 mmol), HCl 37% (0.8 mL, 10 mmol), NaNO_2 in solid (190 mg, 2.75 mmol), solvent $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (445 mg, 1.4 mmol)

Compound was obtained as a dark blue powder in 37 % yield (300 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.57 (s, 1H, NH); 8.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_6); 7.85 (s, 1H, H_3); 7.83 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_5); 7.33 (s, 1H, H_1); 7.09 (s, 1H, H_8); 6.87 (s, 1H, H_8); 2.42 (s, 3H, H_7)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; +Na⁺; + 3 H₃O⁺):
C 33.99 (34.05); H 3.80 (3.65); N 6.79 (6.62); S 10.15 (10.10)

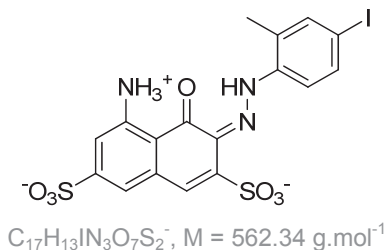
HPLC $t_R = 8.20$ min

MS (ESI)⁺: m/z 480.1 [M-H]⁺

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 543$ nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-iodo-2-methylphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2114



Following the general procedure J,

4-iodo-2-methylaniline (1165 mg, 5 mmol), HCl 37% (1.6 mL, 20 mmol), NaNO₂ in solid (380 mg, 5.5 mmol), solvent H₂O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1591 mg, 5 mmol).

Compound was obtained as a violet powder in 18 % yield (506 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.62 (s, 1H, NH); 7.77 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H₅); 7.65 (s, 1H, H₃); 7.62 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H₆); 7.30 (s, 1H, H₁); 7.06 (s, 1H, H₆); 6.87 (s, 1H, H₈); 2.38 (s, 3H, H₇)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.4 (C₄); 153.5 (C₇); 153.2 (C₂); 142.7 (C₅); 140.7 (C₂); 138.5 (C₆); 136.9 (C₉); 135.6 (C₃); 130.0 (C₃); 126.9 (C₁); 123.0 (C₁); 117.4 (C₅); 113.4 (C₈); 112.1 (C₆); 111.7 (C₁₀); 88.0 (C₄); 16.0 (C₈)

Elemental analysis found (calc.) (+ 2Na⁺; + H₃O⁺):

C 32.55 (32.73); H 2.57 (2.61); N 6.70 (6.56); S 10.22 (9.99)

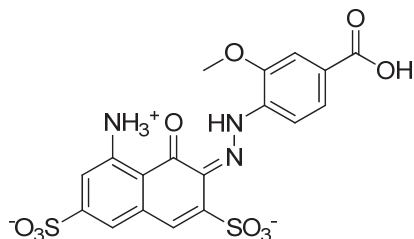
HPLC $t_R = 11.78$ min

MS (ESI): m/z 562.0 [M-H]⁻

UV vis $\lambda_{max} = 543$ nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxy-2-methoxyphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2137



Following the general procedure J,

4-Amino-3-methoxybenzoic acid (418 mg, 2.5 mmol), HCl 37% (0.8 mL, 10 mmol), NaNO₂ in solid (190 mg, 2.75 mmol), solvent H₂O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (445 mg, 1.4 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 69 % yield (480 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.30 (s, 1H, NH); 7.98 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H₆); 7.63 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H₅); 7.59 (d, $J = 1.8 \text{ Hz}$, 1H, H₃); 7.29 (s, 1H, H₁); 7.07 (s, 1H, H₆); 6.85 (s, 1H, H₈); 4.04 (s, 3H, H₈)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.8 (C₄); 169.9 (C₇); 153.8 (C₇); 153.4 (C₂); 146.80 (C₂); 142.8 (C₅); 136.2 (C₉); 135.5 (C₄); 130.7 (C₃); 126.0 (C₁); 123.8 (C₁); 123.1 (C₅); 114.8 (C₆); 113.7 (C₈); 112.5 (C₆); 111.8 (C₁₀); 111.5 (C₃); 56.2 (C₈)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; +Na⁺; + 3 H₃O⁺):

C 33.99 (34.05); H 3.80 (3.65); N 6.79 (6.62); S 10.15 (10.10)

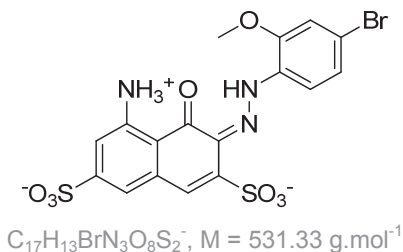
HPLC $t_R = 8.80 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 495.9 [M-H]⁻

UV vis $\lambda_{max} = 544 \text{ nm}$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-bromo-2-methoxyphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2122



Following the general procedure J,

4-Bromo-2-methoxyaniline (505 mg, 2.5 mmol), HCl 37% (0.8 mL, 10 mmol), NaNO₂ in solid (190 mg, 2.75 mmol, solvent H₂O.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (716 mg, 2.25 mmol).

Compound was obtained as a violet powder in 20 % yield (245 mg).

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.35 (s, 1H, NH); 7.85 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H_{6'}); 7.33 (d, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_{3'}); 7.29 (s, 1H, H_{1'}); 7.24 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_{5'}); 7.06 (s, 1H, H_{8'}); 6.87 (s, 1H, H_{6'}); 4.00 (s, 3H, H_{7'})

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.4 (C₄); 153.5 (C₇); 153.1 (C₂); 148.1 (C_{2'}); 142.8 (C₅); 136.3 (C₉); 131.1 (C_{1'}); 129.9 (C₃); 124.1 (C_{5'}); 123.0 (C₁); 116.9 (C_{6'}); 116.3 (C_{4'}); 114.6 (C_{3'}); 113.5 (C₈); 112.1 (C₆); 111.8 (C₁₀); 56.6 (C_{7'})

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + 3 H₃O⁺):

C 30.48 (30.56); H 3.31 (3.29); N 6.27 (6.12); S 9.57 (9.41)

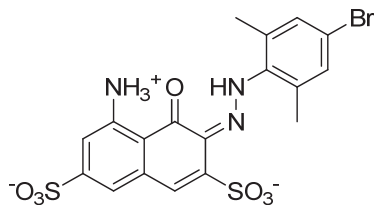
HPLC $t_R = 10.53 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 530.1 [M-H]⁻

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 543 \text{ nm}$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-bromo-2,6-dimethylphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2125



Following the general procedure J,

4-Bromo-2,6-dimethylaniline (500 mg, 2.5 mmol), HCl 37% (0.8 mL, 10 mmol), NaNO₂ in solid (190 mg, 2.75 mmol), solvent H₂O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (445 mg, 1.4 mmol)

Compound was obtained as a violet powder in 24 % yield (180 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.31 (s, 1H, NH); 7.33 (s, 2H, H₃, H₅); 7.31 (s, 1H, H₁); 7.04 (s, 1H, H₆); 6.87 (s, 1H, H₈); 2.55 (s, 6H, H₇)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.0 (C₄); 153.5 (C₇); 153.0 (C₂); 142.7 (C₅); 138.0 (C₁); 136.9 (C₉); 131.6 (C₃'-C₅); 129.8 (C₃); 122.3 (C₁); 116.7 (C₂-C₆); 113.1 (C₈); 112.1 (C₆); 111.6 (C₁₀); 106.8 (C₄); 19.5 (C₇)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + 2 H₃O⁺):

C 33.49 (33.42); H 3.47 (3.26); N 6.16 (6.48); S 9.76 (9.88)

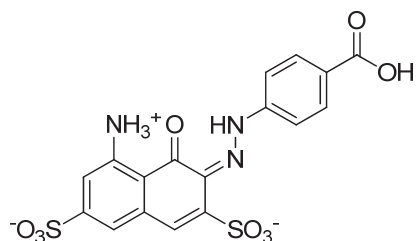
HPLC t_R = 11.96 min

MS (ESI): m/z 530.0 [M-H]⁻

UV vis λ_{max} = 523 nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxyphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2177



Following the general procedure J,

LSP9-2169 (555 mg, 3 mmol), solvent H_2O .

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (573 mg, 1.8 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 10 % yield (92 mg)

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.24 (s, 1H, NH); 7.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_3-H_5); 7.72 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H_2-H_6); 7.30 (s, 1H, H_1); 7.08 (s, 1H, H_6); 6.86 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.9 (C_4); 166.8 (C_7); 153.9 (C_7); 153.4 (C_2); 146.4 (C_4'); 142.8 (C_5); 136.2 (C_9); 130.7 (C_3-C_5); 130.3 (C_3); 125.6 (C_1'); 123.7 (C_1); 115.7 (C_2-C_6); 113.7 (C_8); 112.5 (C_6); 111.5 (C_{10})

Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + 3 H_3O^+):

C 37.81 (37.36); H 3.41 (3.87); N 7.46 (7.86); S 11.02 (11.74)

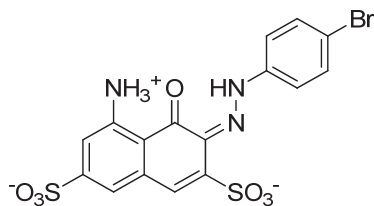
HPLC $t_R = 5.65$ min

MS (ESI): m/z 465.9 $[M-H]^-$

UV vis λ_{max} : 534 nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-bromophenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2120



Following the general procedure J,

4-Bromoaniline (880 mg, 5 mmol), HCl 37% (1.6 mL, 20 mmol), NaNO_2 in solid (190 mg, 2.75 mmol), solvent H_2O .

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (445 mg, 1.4 mmol) .

Compound was obtained as a violet powder in 24 % yield (545 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.34 (s, 1H, NH); 7.64 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_2, H_6); 7.56 (d, $J = 8.8 \text{ Hz}$, 2H, H_3, H_5); 7.26 (s, 1H, H_1); 7.06 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_8); 6.84 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6)

Elemental analysis found (calc.) (+ 2 Na^+):

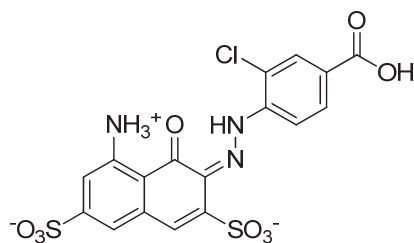
C 34.42 (33.93); H 2.96 (2.49); N 7.55 (7.42); S 10.79 (11.32)

HPLC $t_R = 10.08 \text{ min}$

MS (ESI) $^-$: m/z 499.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 536 \text{ nm}$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxy-2-chlorophenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulphite
LSP9-2192



$C_{17}H_{11}ClN_3O_9S_2^-$, $M = 500.87 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure J,

LSP9-2190 (548 mg, 2.5 mmol), solvent H_2O .

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (477 mg, 1.5 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 84 % yield (630 mg)

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.24 (s, 1H, NH); 8.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_6); 8.0 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_3); 7.93 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 1.6$ Hz, 1H, H_5); 7.36 (s, 1H, H_1); 7.12 (s, 1H, H_6); 6.88 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 182.2 (C_4); 165.9 (C_7); 154.2 (C_7); 153.8 (C_2); 142.9 (C_5); 142.8 (C_4'); 136.0 (C_9); 131.7 (C_3); 130.4 (C_3'); 129.4 (C_5); 126.2 (C_1'); 125.2 (C_1); 119.1 (C_2'); 116.1 (C_6); 114.2 (C_8); 113.2 (C_6); 111.0 (C_{10})

Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + 3 H_3O^+):

C 37.81 (37.36); H 3.41 (3.87); N 7.46 (7.86); S 11.02 (11.74)

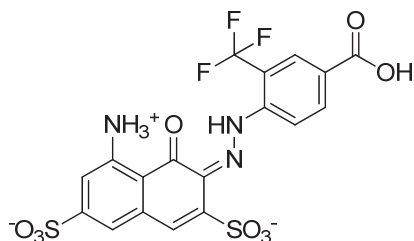
HPLC $t_R = 8.36$ min

MS (ESI) $^-$: m/z 500.0 $[M-H]^-$

UV vis $\lambda_{max} = 536$ nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxy-2-(trifluoromethyl)phenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3041



Following the general procedure J,

4-Amino-3-trifluoromethylbenzoic acid (410 mg, 2 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8.4 mmol), NaNO₂ in solution (180 mg, 2.6 mL), solvent H₂O/EtOH.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (445 mg, 1.4 mmol).

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound was the first eluted and obtained as a violet powder in 13 % yield (98 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.82 (s, 1H, NH); 8.16 (m, 3H, H_{3'}, H_{5'}, H_{6'}); 7.32 (s, 1H, H_{1'}); 7.10 (s, 1H, H_{6'}); 6.86 (s, 1H, H_{8'})

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ

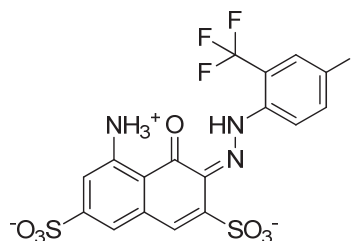
HPLC $t_R = 11.80 \text{ min}$

MS (ESI)⁻: m/z 534.1 [M-H]⁻

UV vis $\lambda_{max} = 529 \text{ nm}$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-iodo-2-(trifluoromethyl)phenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2119



Following the general procedure J,

2-Amino-5-iodobenzotrifluoride (1000 mg, 3.48 mmol), , HCl 37% (1.5 mL, 18 mmol), NaNO₂ in solid (265 mg, 3.83 mmol), solvent H₂O.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (1098 mg, 3.45 mmol).

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound was the first eluted and obtained as a dark blue powder in 2 % yield (40 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 11.05 (brs, 1H, NH); 8.00 (m, 3H, H₃, H₅, H₆); 7.43 (s, 1H, H₁); 7.18 (s, 1H, H₆); 7.00 (s, 1H, H₈)

¹³C NMR (126 MHz, DMSO): δ 172.3 (C₄); 150.3 (C₇); 150.2 (C₂); 145.2 (C₅); 143.8 (C_{1'}); 142.1 (C₅); 136.2 (C₉); 134.1 (C_{3'}); 125.8 (C₃); 125.1 (C₆-C_{7'}); 120.3 (C₁); 117.2 (C₈); 115.2 (C_{2'}); 113.6 (C₆); 110.1 (C₁₀); 91.5 (C_{4'})

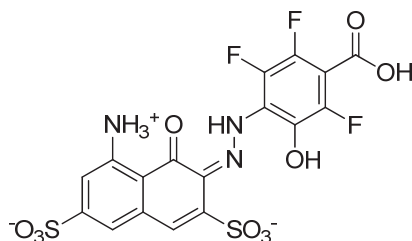
HPLC t_R = 12.38 min

MS (ESI): m/z 615.9 [M-H]⁻

UV vis λ_{max} = 521 nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-carboxy-2,3,5-trifluoro-6-hydroxyphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3031



Following the general procedure J,

4-Bromo-2,3,5,6-tetrafluorobenzoic acid (439 mg, 2.1 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8.4 mmol), NaNO_2 in solution (190 mg, 2.73 mL), solvent H_2O -EtOH.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (431 mg, 1.2 mmol).

Compound was obtained as a violet powder in 52 % yield (335 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.48 (s, 1H, NH); 10.60 (s, 1H, OH); 7.3 (s, 1H, H_1); 7.16 (d, $J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6.9 (d, $J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 182.6 (C_4); 161.6 (C_7); 154.6 (C_7); 154.2 (C_2); 145.4 (C_5); 140.8 (C_5); 136.4 (C_2); 135.8 (C_9); 133.8 (C_6); 130.2 (C_3); 125.1 (C_1); 121.4 (C_1); 114.9 (C_8); 113.9 (C_6); 110.9 (C_{10}); 106.6 (C_4)

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO): δ -139.22 (dd, $J = 8.7 \text{ Hz}$, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1F, F_5); -151.52 (dd, $J = 23.6 \text{ Hz}$, $J = 6.4 \text{ Hz}$, 1F, F_2); -159.85 (dd, $J = 23.6 \text{ Hz}$, $J = 8.7 \text{ Hz}$, 1F, F_3)

Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + 2 Cl^- ; + 2 H_3O^+ ; + H_2O):

C 29.69 (29.66); H 2.36 (2.34); N 5.97 (6.10)

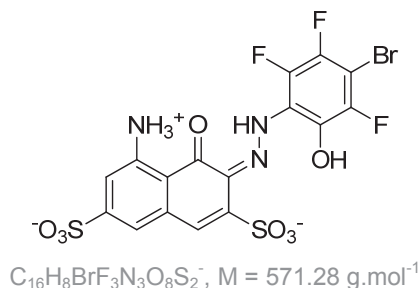
HPLC $t_R = 8.39 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 535.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 539 \text{ nm}$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4-bromo-2,3,5-trifluoro-6-hydroxyphenyl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3032



Following the general procedure J,

4-Bromo-2,3,5,6-tetrafluoroaniline (512 mg, 2.1 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO_2 in solution (188 mg, 2.73 mmol), solvent H_2O -EtOH.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid (382 mg, 1.2 mmol) in 10 mL of H_2O .

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound was obtained as a dark blue solid in 74 % yield (510 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.55 (s, 1H, NH); 10.72 (s, 1H, OH); 7.28 (s, 1H, H_1); 7.14 (s, 1H, H_6); 6.9 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 182.4 (C_4); 154.5 (C_7); 154.1 (C_2); 145.5 (C_5); 140.8 (C_5); 140.1 (C_3); 136.5 (C_2); 135.9 (C_9); 134.4 (C_6); 129.8 (C_3); 124.6 (C_1); 119.0 (C_1); 114.7 (C_8); 113.7 (C_6); 111.0 (C_{10}); 92.54 ($\text{C}_{4'}$)

^{19}F NMR (376 MHz, DMSO): -133.90 (s, 1F, F_5); -145.20 (d, $J = 28 \text{ Hz}$, 1F, F_2); -157.93 (d, $J = 28 \text{ Hz}$, 1F, F_3)

Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + 2 Cl^- ; + 2 H_3O^+ ; + H_2O):

C 26.57 (26.57); H 2.20 (2.09); N 5.46 (5.81)

HPLC $t_R = 12.30 \text{ min}$

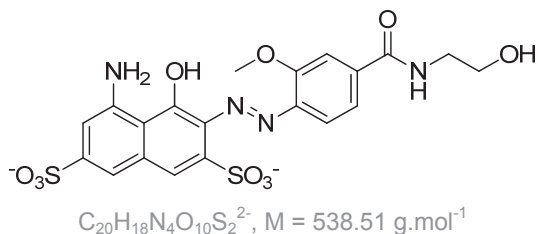
MS (ESI): m/z 569.9 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis $\lambda_{\text{max}} = 539 \text{ nm}$

IX.2.c.v Monazoic dyes: benzamide series

(E)-4-amino-5-hydroxy-6-((4-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)-2-methoxyphenyl)diazenyl)-7-sulfonatophthalen-2-yl sulfite

LSP9-2066



Following the general procedure K,

LSP9-2059 (336 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO_2 (103 mg, 1.5 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (330 mg, 1.35 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 78 % yield (580 mg)

^1H NMR (500 MHz, D_2O - CD_3CN): δ 7.89 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.71(s, 1H, H_3) ; 7.64 (s, 1H, H_1); 7.47(s, 1H, H_6); 7.43 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.40 (s, 1H, H_8); 4.11 (s, 3H, H_8); 3.65 (t, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H, H_3); 3.48 (t, $J = 5.9 \text{ Hz}$, 2H, H_2)

Elemental analysis found (calc.):

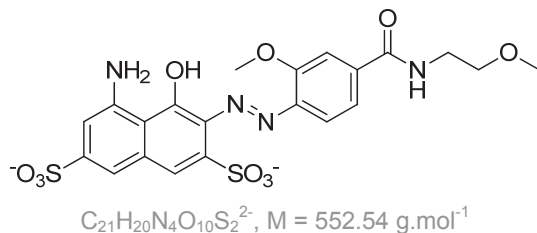
C 27.91(45.65); H 3.51 (3.65); N 6.12 (10.14)

HPLC $t_R = 26.1 \text{ min}$

Salt proportion: 35%

(E)-4-amino-5-hydroxy-6-((2-methoxy-4-((2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)-7-sulfonatophthalen-2-yl sulfite

LSP9-2067



Following the general procedure K,

LSP9-2048 (315mg, 1.5 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO_2 (103 mg, 1.5 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (330 mg, 1.35 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 71% yield (515mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 7.90 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_6); 7.73 (s, 1H, H_3); 7.62 (s, 1H, H_1); 7.49 (s, 1H, H_6); 7.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_5); 7.44 (s, 1H, H_8); 4.01 (s, 3H, H_8); 3.63 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, H_1); 3.42 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H, H_2)

Elemental analysis found (calc.):

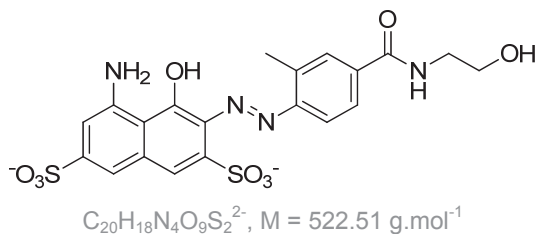
C 27.91(45.65); H 3.51 (3.65); N 6.12 (10.14)

HPLC $t_R = 26.5$ min

Salt proportion: 40%

(E)-4-amino-5-hydroxy-6-((4-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)diazenyl)-7-sulfonatonaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2058



Following the general procedure K,

LSP9-2055 (291 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO_2 (103 mg, 1.5 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (330 mg, 1.35 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 28 % yield (196 mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 7.99 (d, $J = 8.2 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.70 (dd, $J = 8.2 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.60 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.52 (s, 1H, H_1); 7.14 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, H_6); 7.12 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, H_8); 3.63 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{1'}$); 3.42 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{2'}$); 2.43 (s, 3H, H_7)

HPLC $t_R = 26 \text{ min}$

Elemental analysis found (calc.):

C 2.89 (45.97); H 3.11 (3.47); N 0.24 (10.72)

Salt proportion: 95%

After Butanol extraction

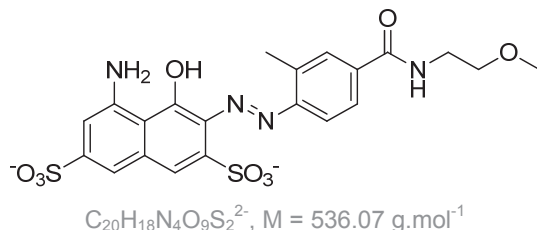
Elemental analysis found (calc.):

C 11.41 (45.97); H 1.11 (3.47); N 3.21 (10.72)

Salt proportion: 75%

(E)-4-amino-5-hydroxy-6-((4-((2-methoxyethyl)carbamoyl)-2-methylphenyl)diazenyl)-7-sulfonatophthalen-2-yl sulfite

LSP9-2064



Following the general procedure K,

LSP9-2052 (312 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO_2 (103 mg, 1.5 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (330 mg, 1.35 mmol).

Compound was obtained as a dark violet powder in 29 % yield (210 mg)

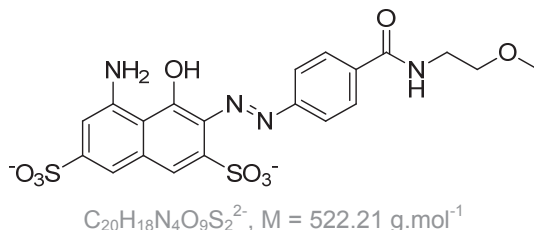
^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 7.90 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.71 (dd, $J = 8.1 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.59 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.51 (s, 1H, H_1); 7.13 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, H_6); 7.11 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, H_8); 3.64 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{1'}$); 3.41 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{2'}$); 3.31 (s, 3H, $\text{H}_{3'}$); 2.43 (s, 3H, $\text{H}_{7'}$)

HPLC $t_R = 26.78 \text{ min}$

Salt proportion: 45%

(E)-4-amino-5-hydroxy-6-((4-((2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)-7-sulfonatophthalen-2-yl sulphite

LSP9-2081



Following the general procedure K,

LSP9-2061 (510 mg, 2.63 mmol), HCl 37% (1.8 mL, 20 mmol), NaNO_2 (182 mg, 2.63 mmol)

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (753 mg, 2.37 mmol).

Compound was obtained as a dark violet powder in 37 % yield (557 mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 7.81 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H, H_3 , H_5); 7.69 (d, $J = 8.9 \text{ Hz}$, 2H, H_2 , H_6); 7.58 (s, 1H, H_1); 7.56 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.3 (d, $J = 1.3 \text{ Hz}$, 1H, H_8); 3.66 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, H_3); 3.45 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, H_2); 3.32 (s, 3H, H_3)

HPLC $t_R = 26.125 \text{ min}$

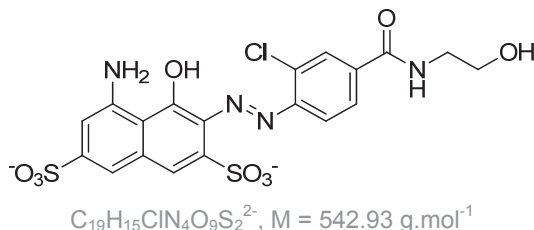
Elemental analysis found (calc.):

C 35.47 (45.97); H 4.09 (3.47); N 8.37 (10.72)

Salt proportion: 20%

(E)-4-amino-6-((2-chloro-4-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)-5-hydroxy-7-sulfonatonaphthalen-2-yl sulphite

LSP9-2057



Following the general procedure K,

LSP9-2038 (510 mg, 1 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), $NaNO_2$ (69 mg, 1 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (286 mg, 0.9 mmol).

Compound was obtained as a dark violet powder in 84 % yield (411 mg)

1H NMR (500 MHz, D_2O - CD_3CN): δ 8.05 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_6); 7.86 (s, 1H, H_3); 7.77 (d, $J = 8$ Hz, 1H, H_5); 7.54 (s, 1H, H_1); 7.13 (s, 2H, H_6, H_8); 3.63 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, $H_{1'}$); 3.41 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, $H_{2'}$)

HPLC $t_R = 25.71$ min

Elemental analysis found (calc.):

C 15.45 (42.03); H 1.96 (2.78); N 3.87 (10.32)

Salt proportion: 65%

After Butanol extraction

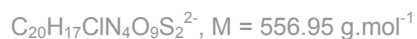
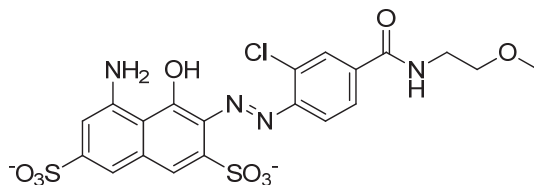
Elemental analysis found (calc.):

C 24.12 (42.03); H 2.96 (2.78); N 5.84 (10.32)

Salt proportion: 45%

(E)-4-amino-6-((2-chloro-4-((2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)-5-hydroxy-7-sulfonatonaphthalen-2-yl sulphite

LSP9-2051



Following the general procedure K,

LSP9-2039 (510 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (1 mL, 12 mmol), NaNO_2 (103 mg, 1.5 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (330 mg, 1.35 mmol).

Compound was obtained as a dark violet powder in 89 % yield (675 mg)

^1H NMR (500 MHz, D_2O - CD_3CN): δ 8.05 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H_6'); 7.86 (s, 1H, H_3'); 7.77 (d, $J = 8 \text{ Hz}$, 1H, H_5'); 7.54 (s, 1H, H_1'); 7.13 (s, 2H, H_6 , H_8); 3.53 (t, $J = 5.8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{1''}$); 3.42 (t, $J = 5.8 \text{ Hz}$, 2H, $\text{H}_{2''}$); 3.29 (s, 3H, $\text{H}_{3''}$)

HPLC $t_R = 26.11 \text{ min}$

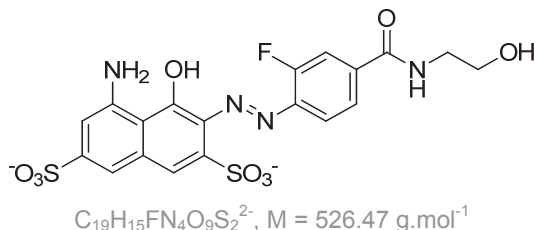
Elemental analysis found (calc.):

C 32.09 (43.13); H 4.01 (3.08); N 6.98 (10.06)

Salts proportion: 25%

(E)-4-amino-6-((2-fluoro-4-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)-5-hydroxy-7-sulfonatonaphthalen-2-yl sulphite

LSP9-2063



Following the general procedure I,

LSP9-2031 (238 mg, 1.2 mmol), HCl 37% (0.8 mL, 10 mmol), NaNO_2 (83 mg, 1.2 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (343 mg, 1.08 mmol).

Compound was obtained as a dark violet powder in 25 % yield (142 mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 8.0 (d, $J = 8.1 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.66 (dd, $J = 8.1 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.62 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.52 (s, 1H, H_1); 7.13 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.12 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_8); 3.63 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, H_3); 3.42 (t, $J = 5.6 \text{ Hz}$, 2H, H_2)

HPLC $t_R = 26.22 \text{ min}$

Elemental analysis found (calc.):

C 4.62 (43.35); H 2.08 (2.87); N 0.77 (10.64)

Salts proportion: 90%

After Butanol extraction

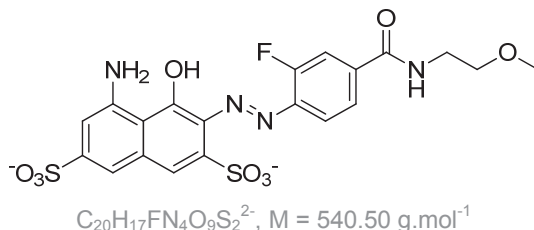
Elemental analysis found (calc.):

C 21.07 (43.35); H 2.24 (2.87); N 5.18 (10.64)

Salts proportion: 50%

(*E*)-4-amino-6-((2-fluoro-4-((2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)-5-hydroxy-7-sulfonatonaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2053



Following the general procedure K,

LSP9-2034 (212 mg, 1 mmol), 5 mL H_2O , HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), NaNO_2 (69 mg, 1 mmol).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (286 mg, 0.9 mmol).

Compound was obtained as a dark violet powder in 59 % yield (130 mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 7.99 (d, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.7 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.66 (d, $J = 1.9 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.51 (s, 1H, H_1); 7.14 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.12 (d, $J = 1.5 \text{ Hz}$, 1H, H_8); 3.64 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, H_3''); 3.42 (t, $J = 5.7 \text{ Hz}$, 2H, H_2''); 2.43 (s, 3H, H_3'')

HPLC $t_R = 27.01 \text{ min}$

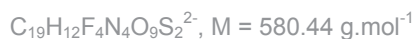
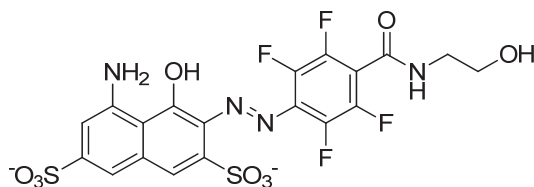
Elemental analysis found (calc.):

C 4.01 (44.44); H 1.59 (3.17); N 0.32 (10.37)

Salts proportion: 90%

(E)-4-amino-5-hydroxy-7-sulfonato-6-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-hydroxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)naphthalen-2-yl sulphite

LSP9-2054



Following the general procedure K,

LSP9-2033 (177 mg, 0.7 mmol), HCl 37% (0.5 mL, 5.6 mmol), NaNO_2 (48 mg, 0.7 mmol)

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (200 mg, 0.63 mmol).

Compound was obtained as a grey powder in 19 % yield (66 mg)

^1H NMR (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}-\text{CD}_3\text{CN}$): δ 7.51 (s, 1H, H_1); 7.14 (s, 1H, H_6); 7.12 (s, 1H, H_8); 3.62 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, H_3'); 3.42 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, H_2')

HPLC $t_R = 26.52$ min

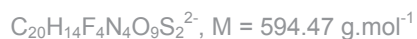
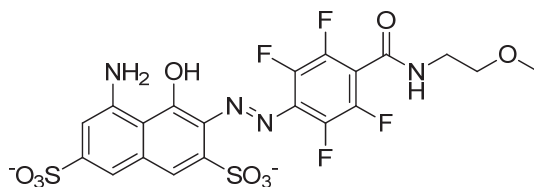
Elemental analysis found (calc.):

C 16.40 (39.32); H 1.93 (2.08); N 3.78 (9.65)

Salts proportion: 60%

(E)-4-amino-5-hydroxy-7-sulfonato-6-((2,3,5,6-tetrafluoro-4-((2-methoxyethyl)carbamoyl)phenyl)diazenyl)naphthalen-2-yl sulphite

LSP9-2056



Following the general procedure K,

LSP9-2037 (266 mg, 1 mmol), HCl 37% (0.7 mL, 58 mmol), NaNO_2 (69 mg, 1 mmol)

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (286 mg, 0.9 mmol).

Compound was obtained as a blue-purple powder in 31 % yield (170 mg)

^1H NMR (500 MHz, D_2O - CD_3CN): δ 7.50 (s, 1H, H_1); 7.17 (s, 1H, H_6); 7.13 (s, 1H, H_8); 3.51 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 2H, H_3); 3.48 (t, $J = 5.5 \text{ Hz}$, 2H, H_2); 3.29 (s, 3H, H_3)

HPLC $t_R = 26.15 \text{ min}$

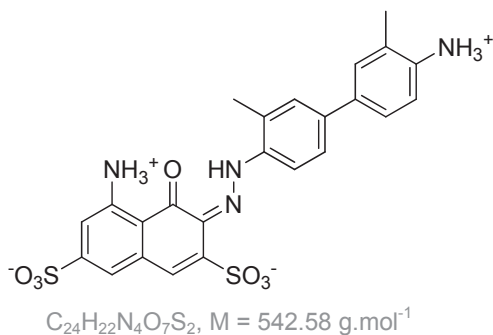
Elemental analysis found (calc.):

C 5.95 (40.41); H 1.54 (2.37); N 0.47 (9.42)

Salts proportion: 85%

IX.2.c.vi Monoazoic dyes: biaryl series

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4'-ammonio-3,3'-dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4-yl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2187

Following the general procedure J,

LSP9-2181 (296 mg, 1 mmol), solvent H_2O (30 mL).

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (216 mg, 0.6 mmol).

Compound was obtained as a red powder in 25 % yield (82 mg).

1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.82 (s, 1H, NH); 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_6); 7.60 (s, 1H, H_3); 7.55 (m, 3H, H_3 , H_6 , H_5); 7.32 (s, 1H, H_1); 7.31 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_5); 7.06 (s, 1H, H_6); 6.88 (s, 1H, H_8); 2.47 (s, 3H, H_7); 2.36 (s, 3H, H_7)

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + H_3O^+ ; + 2 H_2O):

C 42.00 (41.98); H 4.29 (4.29); N 7.75 (8.10); S 8.68 (9.27)

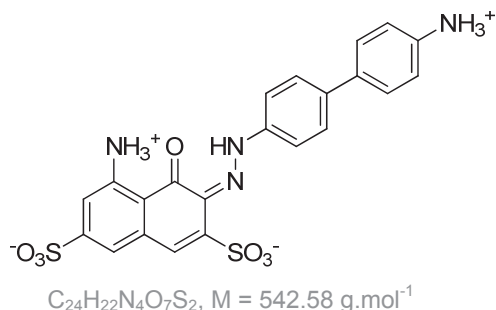
HPLC: $t_R = 9.95$ min

MS (ESI): m/z 541.1 $[M-H]^-$

UV vis $\lambda_{max} = 545$ nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4'-ammonio-[1,1'-biphenyl]-4-yl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-2142



Benzidine (276 mg, 1.5 mmol) was mixed with iced water (7 mL) and HCl 37% (0.5 mL, 6 mmol), then NaNO_2 (83 mg, 1.2 mmol) was added. Reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h. Solvents were removed under reduced pressure then water (100 mL) was added. Unreactive products were extracted by EtAcO (2 x 100 mL). Aqueous layer was concentrated to 20 mL.

Following the general procedure J,

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (287 mg, 0.9 mmol).

Compound was obtained as a dark blue powder in 40 % yield (186 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.24 (s, 1H, NH); 7.70 (m, 6H, H_2^- , H_3^- , H_5^- , H_6^- , H_3' , H_5'); 7.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_2^- , H_6^-); 7.30 (s, 1H, H_1); 7.06 (s, 1H, H_6); 6.88 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.3; 153.5; 153.0; 142.6; 142.30; 135.1; 134.6; 129.1; 127.3; 127.3; 122.8; 116.8; 113.4; 112.0; 111.9

Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + 3 H_3O^+):

C 44.18 (44.44); H 4.31 (4.58); N 9.06 (9.42); S 10.09 (10.79)

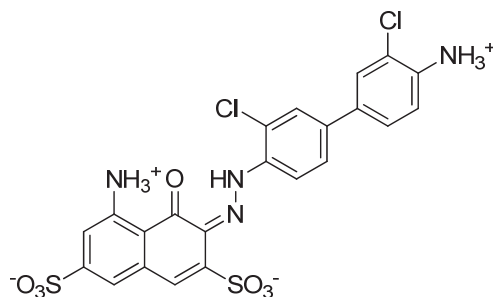
HPLC: $t_R = 8.44$ min

MS (ESI) $^-$: m/z 513.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis λ_{max} : 537 nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4'-ammonio-3,3'-dichloro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulphite

LSP9-3075



3,3'-dichlorobenzidine (978 mg, 3 mmol) was mixed with iced water (14 mL) and HCl 37% (1 mL, 12 mmol), then NaNO_2 (166 mg, 2.4 mmol) was added. Reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h. Solvents were removed under reduced pressure then HCL solution (1M) was added to pH 2. Unreactive products were extracted by EtOAc (4 x 250 mL). Aqueous layer was concentrated in vacuo.

Following the general procedure J,

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (285 mg, 0.9 mmol)

.

Compound was obtained as a dark blue powder in 42 % yield (220 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.69 (s, 1H, NH); 8.10 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_6); 7.76 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H_3); 7.69 (dd, $J = 8.7$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H, H_5); 7.64 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_3); 7.47 (dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.9$ Hz, 1H, H_5); 7.32 (s, 1H, H_1); 7.08 (s, 1H, H_6); 6.91 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H_6); 6.88 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.5; 153.8; 153.3; 142.7; 137.5; 136.20; 135.9; 130.4; 126.7; 125.8; 125.5; 123.5; 120.4; 117.5; 113.8; 113.7; 112.4; 11.5

Elemental analysis found (calc.) (+ NaCl; + H_3O^+ ; + 2 H_2O):

C 40.18 (40.48); H 3.72 (3.69); N 8.15 (8.21); S 8.68 (9.40)

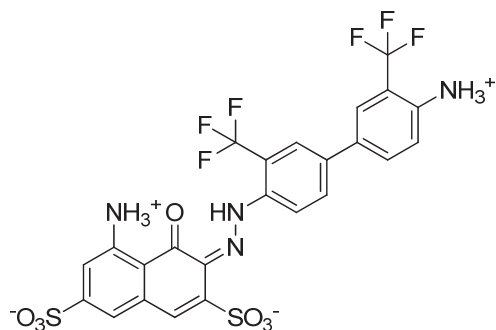
HPLC: $t_R = 12.71$ min

MS (ESI): m/z 583.01 $[\text{M}-\text{H}]^-$

UV vis λ_{max} : 551 nm

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4'-ammonio-3,3'-bis(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3070



$C_{24}H_{16}F_6N_4O_7S_2$, $M = 650.53 \text{ g.mol}^{-1}$

3,3'-bis(trifluoromethyl)benzidine (9640 mg, 2 mmol) was mixed with iced water (10 mL), iced EtOH (5 mL) and HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol), then NaNO_2 (138 mg, 2 mmol) was added. Reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h. Solvents were removed under reduced pressure then HCL solution (1M) was added to pH 2. Unreactive products were extracted by EtAcO (4 x 250 mL). Aqueous layer was concentrated in vacuo.

Following the general procedure J,

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (223 mg, 0.7 mmol).

The crude product was purified two time by preparative HPLC gradient P2 then gradient P1.

Compound was obtained as a dark blue powder in 2 % yield (11 mg).

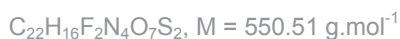
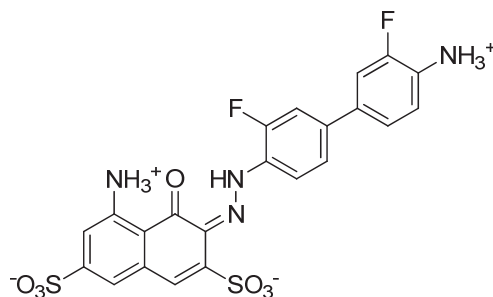
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO): δ 15.69 (s, 1H, NH); 8.10 (m, 6H, $\text{H}_3\text{''}-\text{H}_5\text{''}-\text{H}_6\text{''}-\text{H}_3\text{'-H}_5\text{'-H}_6\text{'}$); 7.35 (s, 1H, H_1); 7.12 (s, 1H, H_6); 6.89 (s, 1H, H_8)

HPLC : $t_R = 11.042 \text{ min}$

MS (ESI)^- : m/z 649.6 $[\text{M-H}]^-$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4'-ammonio-3,3'-difluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3073



LSP9-3024 (880 mg, 4 mmol) was mixed with iced water (10 mL) then HCl 37% (1.33 mL, 16 mmol) was added. NaNO_2 in solution at 1M (3.6 mL, 3.6 mmol) was added by portion of 400 μL during 60 min. Reaction mixture was stirred at 0°C for 1 h.

Following the general procedure J,

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (445 mg, 0.7 mmol) .

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound was obtained as a dark blue powder in 41 % yield (159 mg).

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.63 (s, 1H, NH); 8.02 (t, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 7.63 (dd, $J = 13.1 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.58 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.50 (dd, $J = 12.7 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_3); 7.37 (dd, $J = 8.6 \text{ Hz}$, $J = 1.7 \text{ Hz}$, 1H, H_5); 7.31 (s, 1H, H_1); 7.08 (s, 1H, H_6); 6.90 (t, $J = 8.6 \text{ Hz}$, 1H, H_6); 6.87 (s, 1H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 181.6 (C_4); 153.7 (C_7); 153.3 (C_2); 152.2 (C_2'); 150.3 (C_2'); 142.6 (C_5); 139.2 (C_4'); 136.2 (C_9); 136.0 (C_4'); 130.3 (C_3); 129.0 (C_1'); 123.3 (C_1); 122.5 (C_5'); 122.4 (C_5'); 117.4 (C_6'); 117.2 (C_6'); 113.6 (C_8); 113.0 (C_3'); 112.5 (C_1'); 112.3 (C_6); 112.2 (C_3'); 111.6 (C_{10})

Elemental analysis found (calc.) (+ Na^+ ; + Cl^- ; + 2 H_2O):

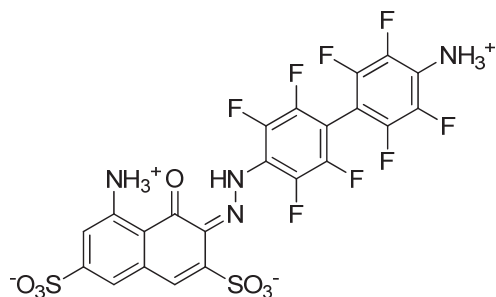
C 40.96 (40.97); H 3.13 (3.13); N 8.80 (8.69); S 9.88 (9.94)

HPLC: $t_R = 10.63 \text{ min}$

MS (ESI): m/z 549.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$

(E)-4-Ammonio-6-(2-(4'-ammonio-2,2',3,3',5,5',6,6'-octafluoro-[1,1'-biphenyl]-4-yl)hydrazono)-5-oxo-7-sulfonato-5,6-dihydronaphthalen-2-yl sulfite

LSP9-3071



$C_{22}H_{10}F_8N_4O_7S_2$, $M = 658.45 \text{ g.mol}^{-1}$

3,3'-Bis(trifluoromethyl)benzidine (640 mg, 2 mmol) was mixed with iced water (10 mL), iced EtOH (5 mL) and HCl 37% (0.7 mL, 8 mmol) was added. NaNO₂ in solution at 1M (2 mL, 2 mmol) was added by portion of 200 µL during 60 min. Reaction mixture was stirred at 0°C for 1.5 h.

Following the general procedure J,

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (223 mg, 0.7 mmol).

The crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound was obtained as a dark blue powder in 2 % yield (9 mg).

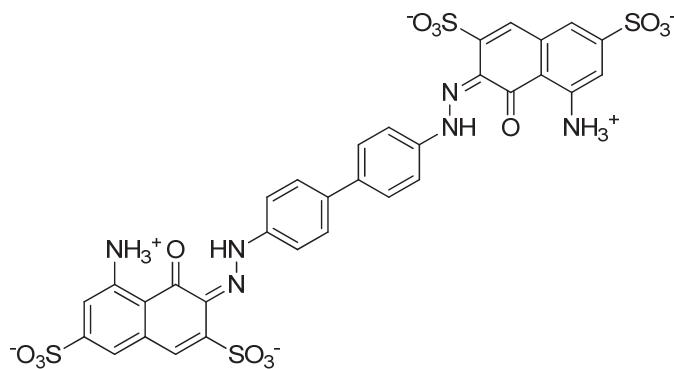
¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.12 (s, 1H, NH); 7.29 (s, 1H, H₁); 7.11 (s, 1H, H₆); 6.87 (s, 1H, H₈)

HPLC: $t_R = 11.709 \text{ min}$

IX.2.c.vii Diazoic dyes: Trypan Blue like

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-([1,1'-Biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-3079



$C_{32}H_{22}N_6O_{14}S_4^{2-}$, $M = 842.81 \text{ g.mol}^{-1}$

Following the general procedure J

Benzidine (553 mg, 3 mmol), HCl 37% (2.1 mL, 24 mmol), NaNO_2 in solid (455 mg, 6.6 mmol), solvent EtOH.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1624 mg, 5.1 mmol).

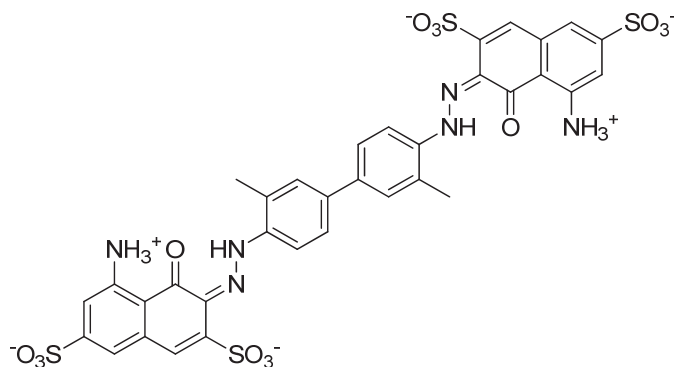
Compound was obtained as a dark blue powder in 96 % yield (2.4 g)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.00 (br s, 2H, NH); 7.79 (s, 2H, $\text{H}_3\text{-H}_5\text{-H}_3'\text{-H}_5'$); 7.32 (s, 2H, H_1); 7.07 (s, 2H, H_6); 6.90 (s, 2H, H_8)

^{13}C NMR (126 MHz, DMSO): δ 183.2; 155.2; 154.9; 144.7; 143.8; 138.3; 137.4; 131.0; 129.1; 124.5; 118.9; 115.3; 113.9; 113.8

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(3,3'-Dimethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-2097



Following the general procedure J

Tolidine (1010 mg, 5 mmol), HCl 37% (2 mL, 22 mmol), NaNO₂ in solid (759 mg, 11 mmol), solvent H₂O.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (2865 mg, 9 mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

Compound was obtained as a dark blue powder in 3 % yield (130 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.62 (s, 2H, NH); 7.77 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₅); 7.65 (s, 2H, H₃); 7.62 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H₆); 7.30 (s, 2H, H₁); 7.06 (s, 2H, H₆); 6.87 (s, 2H, H₈); 2.38 (s, 6H, CH₃)

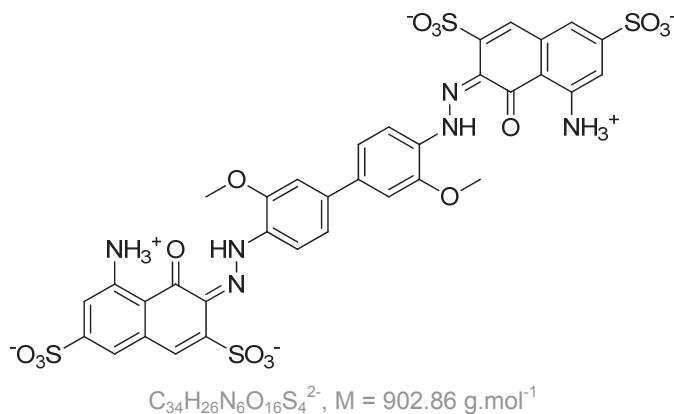
Elemental analysis found (calc.) (+ 2 Na⁺):

C 44.52 (44.54); 2.87 (2.86); N 9.23 (9.17); S 14.06 (13.99)

HPLC: *t_R* = 12.15 min

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(3,3'-Dimethoxy-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-2107



Following the general procedure J

Dianisidine (733 mg, 3 mmol), HCl 37% (1.5 mL, 18 mmol), NaNO₂ in solid (455 mg, 6.6 mmol), solvent H₂O.

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1720 mg, 5.4 mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

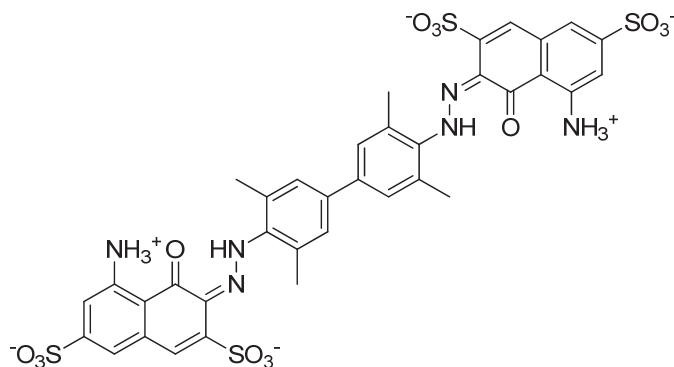
Compound was obtained as a dark blue powder in 6 % yield (162 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.34 (s, 2H, NH); 7.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H_{6'}); 7.33 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, H_{3'}); 7.30 (s, 2H, H_{1'}); 7.23 (dd, $J = 8.6$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 2H, H_{5'}); 7.10 (s, 2H, H₈); 6.88 (s, 2H, H₆); 3.98 (s, 6H, H_{7'})

HPLC: $t_R = 12.88$ min

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(3,3',5,5'-Tetramethyl-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-2106



Following the general procedure J

3,3',5,5'-tTetramethylbenzidine (721 mg, 3 mmol), HCl 37% (1.5 mL, 18 mmol), NaNO_2 in solid (455 mg, 6.6 mmol), solvent H_2O

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1720 mg, 5.4 mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2.

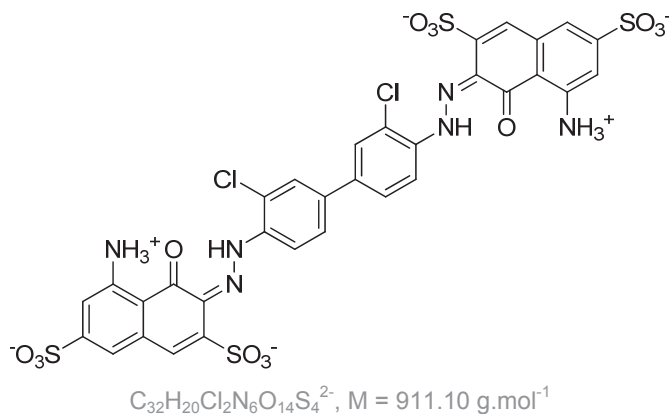
Compound was obtained as a dark blue powder in 8 % yield (215 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.29 (s, 2H, NH); 7.31 (s, 4H, H_3 , H_5); 7.30 (s, 2H, H_1); 7.05 (s, 2H, H_6); 6.85 (s, 2H, H_8); 2.57 (s, 12H, H_7)

HPLC: $t_R = 12.20 \text{ min}$

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(3,3'-dichloro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-2103



Following the general procedure J

2,2'-dichlorobenzidine (657 mg, 2 mmol), HCl 37% (1.3 mL, 16 mmol), NaNO_2 in solution (5.2 mL, 5.2 mmol), solvent $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1145 mg, 3.6 mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2 and gradient P3.

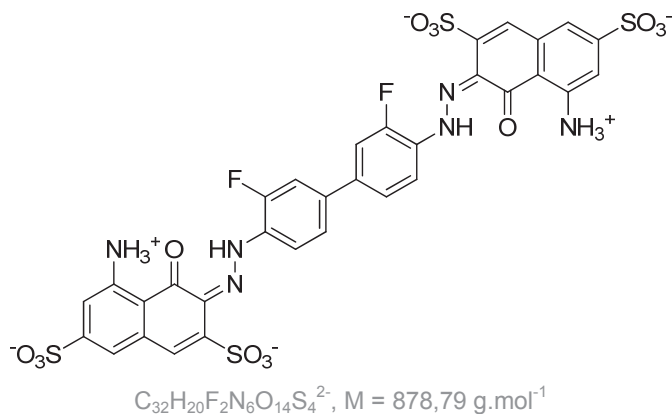
Compound was obtained as a dark blue solid in 1 % yield (19 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.35 (s, 2H, NH); 8.08 (d, $J = 8.5 \text{ Hz}$, 2H, H_6); 7.95 (d, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 2H, H_3); 7.89 (dd, $J = 8.5 \text{ Hz}$, $J = 1.4 \text{ Hz}$, 2H, H_5); 7.34 (s, 2H, H_1); 7.10 (s, 2H, H_6); 6.86 (s, 2H, H_8)

HPLC: $t_R = 12.35 \text{ min}$

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(3,3'-difluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-2105



Following the general procedure J

LSP9-3024 (440 mg, 2 mmol), HCl 37% (1.3 mL, 16 mmol), NaNO₂ in solution (5.2 mL, 5.2 mmol), solvent H₂O/EtOH

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1145 mg, 3.6mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2 and gradient P4.

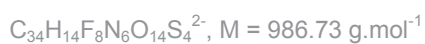
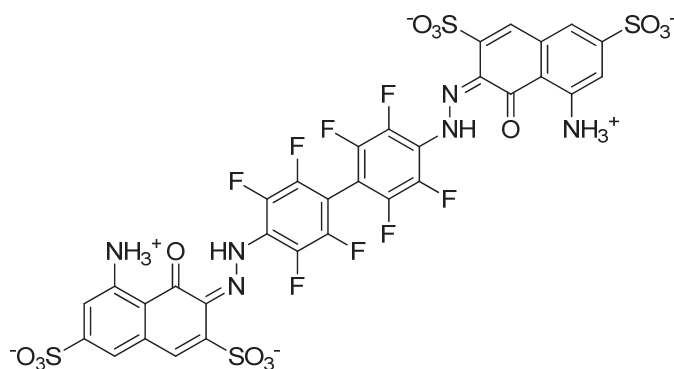
Compound was obtained as a dark blue solid in 2 % yield (35 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.45 (s, 2H, NH); 7.80 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, H₆); 7.79 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₃); 7.64 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 1.5 Hz, 2H, H₅); 7.30 (s, 2H, H₁); 7.08 (s, 2H, H₆); 6.86 (s, 2H, H₈)

HPLC: *t_R* = 12.48 min

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(Perfluoro-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-1148



Following the general procedure J

4,4'-diaminooctafluorobenzidine (510 mg, 2 mmol), HCl 37% (1.3 mL, 16 mmol), NaNO₂ in solution (5.2 mL, 5;2 mmol), solvent H₂O/EtOH

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (1145 mg, 3.6mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2 and gradient P3.

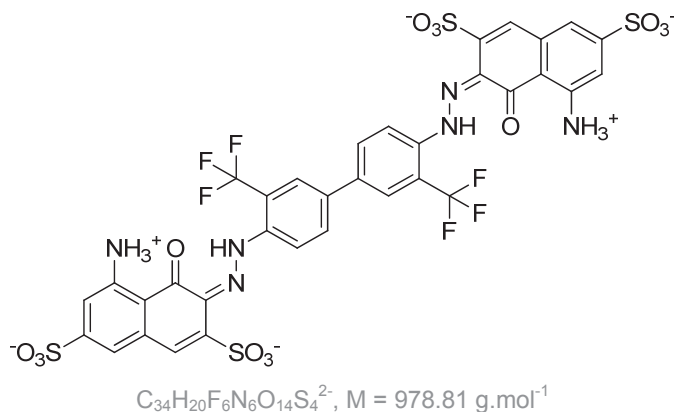
Compound was obtained as a dark blue solid in 3 % yield (59 mg)

¹H NMR (500 MHz, DMSO): δ 15.60 (s, 2H, NH); 7.31 (s, 2H, H₁); 7.17 (s, 2H, H₆); 6.89 (s, 2H, H₈)

HPLC: $t_R = 11.77 \text{ min}$

(3*E*,3'*E*)-3,3'-(2,2'-(3,3'-bis(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(hydrazin-2-yl-1-ylidene))bis(5-ammonio-4-oxo-3,4-dihydronaphthalene-2,7-disulfonate)

LSP9-3076



Following the general procedure E

3,3'-bis(trifluoromethyl)benzidine (478 mg, 1.5 mmol), HCl 37% (1.5 mL, 18 mmol), NaNO_2 in powder (263 mg, 3.8 mmol), solvent H_2O .

5-Amino-4-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid monosodium salt (859 mg, 2,7 mmol).

The dark blue crude product was purified by preparative HPLC gradient P2, gradient P2 and HPLC gradient P4

Compound was obtained as a dark blue solid in 1 % yield (15 mg)

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 16.05 (brs, 1H, NH); 7,95 (m, 6H, H_3 , H_5 , H_6); 7.35 (s, 2H, H_1); 7.19 (s, 2H, H_6); 6,95 (s, 2H, H_8)

HPLC: $t_R = 12.25 \text{ min}$

Annexes

Annexes

Article

“Rose Bengal analogs and vesicular glutamate transporters (VGLUTs)”

Nicolas Pietrancosta, Albane Kessler, Franck-Cyril Favre-Besse, Nicolas Triballeau, Thomas Quentin,
Bruno Giros, Salah El Mestikawy, Francine Acher

Bioorganic & Medicinal Chemistry **2010**, 18, 6922-6933

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Watkins, J. C.; Jane, D. E. The glutamate story. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, 147, S100-S108.
2. Krebs, H. A. Metabolism of amino-acids: The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *Biochem. J.* **1935**, 29, 1951-1969.
3. Curtis, D. R.; Watkins, J. C. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J. Neurochem.* **1960**, 6, 117-41.
4. Fonnum, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **1984**, 42, 1-11.
5. Hawkins, R. A. The blood-brain barrier and glutamate. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, 90, 867s-874s.
6. Takahashi, T.; Toda, E.; Singh, R. B.; De Meester, F.; Wilezynska, A.; Wislon, D.; Juneja, L. R. Essential and non-Essential Amino Acids in Relation to Glutamate. *Open Nutraceuticals J.* **2011**, 4, 205-2012.
7. Danbolt, N. C. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* **2001**, 65, 1-105.
8. Hertz, L.; Zielke, H. R. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* **2004**, 27, 735-743.
9. Tapiero, H.; Mathe, G.; Couvreur, P.; Tew, K. D. Dossier: Free amino acids in human health and pathologies - II. Glutamine and glutamate. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, 446-457.
10. Roberts, E.; Frankel, S. gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* **1950**, 187, 55-63.
11. Featherstone, D. E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. *ACS Chem. Neurosci.* **2010**, 1, 4-12.
12. Recasens, M.; Guiramand, J.; Aimar, R.; Abdulkarim, A.; Barbanel, G. Metabotropic glutamate receptors as drug targets. *Curr. Drug Targets* **2007**, 8, 651-81.
13. Attwell, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1023S-5S.
14. Meldrum, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1007S-15S.
15. Tzschentke, T. M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutical implications -- an introduction. *Amino Acids* **2002**, 23, 147-52.
16. Foster, A. C.; Kemp, J. A. Glutamate- and GABA-based CNS therapeutics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 7-17.
17. Muir, K. W. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 53-60.
18. Lucas, D. R.; Newhouse, J. P. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Archiv. Ophthalmol.* **1957**, 58, 193-201.
19. Olney, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* **1969**, 164, 719-21.
20. Smith, Q. R. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. *J. Nutr.* **2000**, 130, 1016s-1022s.
21. Kirino, T. [Neuronal degeneration and glutamate]. *Rinsho Shinkeigaku* **1989**, 29, 1522-5.
22. Albin, R. L.; Greenamyre, J. T. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* **1992**, 42, 733-738.
23. Benveniste, H.; Drejer, J.; Schousboe, A.; Diemer, N. H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* **1984**, 43, 1369-74.
24. Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, 4, 552-65.
25. Szydłowska, K.; Tymianski, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* **2010**, 47, 122-129.
26. Choi, D. W.; Mauluccigedde, M.; Kriegstein, A. R. Glutamate Neurotoxicity in Cortical Cell-Culture. *J. Neurosci.* **1987**, 7, 357-368.

27. Ha, J. S.; Lee, C.-S.; Maeng, J.-S.; Kwon, K.-S.; Park, S. S. Chronic glutamate toxicity in mouse cortical neuron culture. *Brain Res.* **2009**, 1273, 138-143.
28. Rajendra, W.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Neuroprotection and peptide toxins. *Brain Res. Rev.* **2004**, 45, 125-41.
29. al Qatari, M.; Khan, S.; Harris, B.; Littleton, J. Acamprosate Is Neuroprotective Against Glutamate-induced Excitotoxicity When Enhanced by Ethanol Withdrawal in Neocortical Cultures of Fetal Rat Brain. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **2001**, 25, 1276-1283.
30. Bosel, J.; Gandor, F.; Harms, C.; Synowitz, M.; Harms, U.; Djoufack, P. C.; Megow, D.; Dirnagl, U.; Hortnagl, H.; Fink, K. B.; Endres, M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J. Neurochem.* **2005**, 92, 1386-98.
31. Fang, J. H.; Wang, X. H.; Xu, Z. R.; Jiang, F. G. Neuroprotective effects of bis(7)-tacrine against glutamate-induced retinal ganglion cells damage. *BMC Neurosci.* **2010**, 11, 31.
32. Zhang, Q.; Shen, M.; Ding, M.; Shen, D.; Ding, F. The neuroprotective action of pyrroloquinoline quinone against glutamate-induced apoptosis in hippocampal neurons is mediated through the activation of PI3K/Akt pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2011**, 252, 62-72.
33. Walton, H. S.; Dodd, P. R. Glutamate-glutamine cycling in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* **2007**, 50, 1052-1066.
34. Sanacora, G.; Zarate, C. A.; Krystal, J. H.; Manji, H. K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Rev. Drug Discov.* **2008**, 7, 426-37.
35. Mayer, M. L.; Armstrong, N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annual Rev. Physiol.* **2004**, 66, 161-81.
36. Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **1999**, 51, 7-61.
37. Pinheiro, P. S.; Mulle, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nature Rev. Neurosci.* **2008**, 9, 423-36.
38. Hollmann, M.; O'Shea-Greenfield, A.; Rogers, S. W.; Heinemann, S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* **1989**, 342, 643-8.
39. Mayer, M. L. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **2006**, 440, 456-62.
40. Pin, J. P.; Duvoisin, R. The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* **1995**, 34, 1-26.
41. Bockaert, J.; Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **1999**, 18, 1723-1729.
42. Bockaert, J.; Pin, J. P. [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]. *C. R. Acad. Sci. III* **1998**, 321, 529-51.
43. Bridges, T. M.; Lindsley, C. W. G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3, 530-41.
44. Rondard, P.; Liu, J.; Huang, S.; Malhaire, F.; Vol, C.; Pinault, A.; Labesse, G.; Pin, J. P. Coupling of agonist binding to effector domain activation in metabotropic glutamate-like receptors. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 24653-61.
45. Kuzmiski, J. B.; Bains, J. S. Metabotropic glutamate receptors: gatekeepers of homeostasis. *J. Neuroendocrinol.* **2010**, 22, 785-92.
46. Ferraguti, F.; Shigemoto, R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res.* **2006**, 326, 483-504.
47. Nicoletti, F.; Battaglia, G.; Storto, M.; Ngomba, R. T.; Iacovelli, L.; Arcella, A.; Gradini, R.; Sale, P.; Rampello, L.; De Vita, T.; Di Marco, R.; Melchiorri, D.; Bruno, V. Metabotropic glutamate receptors: beyond the regulation of synaptic transmission. *Psychoneuroendocrinology* **2007**, 32 Suppl 1, S40-5.
48. Wright, R. A.; Johnson, B. G.; Zhang, C.; Salhoff, C.; Kingston, A. E.; Calligaro, D. O.; Monn, J. A.; Schoepp, D. D.; Marek, G. J. CNS distribution of metabotropic glutamate 2 and 3 receptors: Transgenic mice and [³H]LY459477 autoradiography. *Neuropharmacology* **2012**.
49. Duty, S. Therapeutic potential of targeting group III metabotropic glutamate receptors in the treatment of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 161, 271-87.
50. Amalric, M.; Lopez, S.; Goudet, C.; Fisone, G.; Battaglia, G.; Nicoletti, F.; Pin, J. P.; Acher, F. C. Group III and subtype 4 metabotropic glutamate receptor agonists: Discovery and pathophysiological applications in Parkinson's disease. *Neuropharmacology* **2012**, in press.

51. Kanai, Y.; Hediger, M. A. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflügers Archiv.* **2004**, 447, 469-79.
52. Bridges, R. J.; Esslinger, C. S. The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. *Pharmacol. Ther.* **2005**, 107, 271-85.
53. Zerangue, N.; Kavanaugh, M. P. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **1996**, 383, 634-7.
54. Shigeri, Y.; Seal, R. P.; Shimamoto, K. Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res. Rev.* **2004**, 45, 250-265.
55. Storck, T.; Schulte, S.; Hofmann, K.; Stoffel, W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 10955-9.
56. Pines, G.; Danbolt, N. C.; Bjoras, M.; Zhang, Y.; Bendahan, A.; Eide, L.; Koepsell, H.; Storm-Mathisen, J.; Seeberg, E.; Kanner, B. I. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* **1992**, 360, 464-7.
57. Kanai, Y.; Hediger, M. A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **1992**, 360, 467-71.
58. Arriza, J. L.; Fairman, W. A.; Wadiche, J. I.; Murdoch, G. H.; Kavanaugh, M. P.; Amara, S. G. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* **1994**, 14, 5559-69.
59. Fairman, W. A.; Vandenberg, R. J.; Arriza, J. L.; Kavanaugh, M. P.; Amara, S. G. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **1995**, 375, 599-603.
60. Arriza, J. L.; Eliasof, S.; Kavanaugh, M. P.; Amara, S. G. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 4155-60.
61. Yernool, D.; Boudker, O.; Jin, Y.; Gouaux, E. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature* **2004**, 431, 811-8.
62. Maragakis, N. J.; Rothstein, J. D. Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol. Dis.* **2004**, 15, 461-73.
63. Bar-Peled, O.; Ben-Hur, H.; Bieganski, A.; Groner, Y.; Dewhurst, S.; Furuta, A.; Rothstein, J. D. Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *J. Neurochem.* **1997**, 69, 2571-80.
64. Furuta, A.; Rothstein, J. D.; Martin, L. J. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* **1997**, 17, 8363-75.
65. Lauriat, T. L.; McInnes, L. A. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol. Psychiatry* **2007**, 12, 1065-78.
66. Sheldon, A. L.; Robinson, M. B. The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem. Int.* **2007**, 51, 333-355.
67. Furuta, A.; Martin, L. J.; Lin, C. L.; Dykes-Hoberg, M.; Rothstein, J. D. Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* **1997**, 81, 1031-42.
68. Nieoullon, A.; Canolle, B.; Masméjean, F.; Guillet, B.; Pisano, P.; Lortet, S. The neuronal excitatory amino acid transporter EAAC1/EAAT3: does it represent a major actor at the brain excitatory synapse? *J. Neurochem.* **2006**, 98, 1007-18.
69. Massie, A.; Cnops, L.; Smolders, I.; McCullumsmith, R.; Kooijman, R.; Kwak, S.; Arckens, L.; Michotte, Y. High-affinity Na⁺/K⁺-dependent glutamate transporter EAAT4 is expressed throughout the rat fore- and midbrain. *J. Comp. Neurol.* **2008**, 511, 155-72.
70. Kim, K.; Lee, S. G.; Kegelman, T. P.; Su, Z. Z.; Das, S. K.; Dash, R.; Dasgupta, S.; Barral, P. M.; Hedvat, M.; Diaz, P.; Reed, J. C.; Stebbins, J. L.; Pellecchia, M.; Sarkar, D.; Fisher, P. B. Role of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT2) and glutamate in neurodegeneration: opportunities for developing novel therapeutics. *J. Cell. Physiol.* **2011**, 226, 2484-93.
71. Vandenberg, R. J.; Mitrovic, A. D.; Chebib, M.; Balcar, V. J.; Johnston, G. A. Contrasting modes of action of methylglutamate derivatives on the excitatory amino acid transporters, EAAT1 and EAAT2. *Mol. Pharmacol.* **1997**, 51, 809-15.

72. Bunch, L.; Krosgaard-Larsen, P. Subtype selective kainic acid receptor agonists: discovery and approaches to rational design. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 3-28.
73. Shimamoto, K.; Lebrun, B.; Yasuda-Kamatani, Y.; Sakaitani, M.; Shigeri, Y.; Yumoto, N.; Nakajima, T. DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 195-201.
74. Shimamoto, K.; Sakai, R.; Takaoka, K.; Yumoto, N.; Nakajima, T.; Amara, S. G.; Shigeri, Y. Characterization of novel L-threo-beta-benzyloxyaspartate derivatives, potent blockers of the glutamate transporters. *Mol. Pharmacol.* **2004**, *65*, 1008-1015.
75. Esslinger, C. S.; Agarwal, S.; Gerdes, J.; Wilson, P. A.; Davis, E. S.; Awes, A. N.; O'Brien, E.; Mavencamp, T.; Koch, H. P.; Poulsen, D. J.; Rhoderick, J. F.; Chamberlin, A. R.; Kavanaugh, M. P.; Bridges, R. J. The substituted aspartate analogue L-beta-threo-benzyl-aspartate preferentially inhibits the neuronal excitatory amino acid transporter EAAT3. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 850-61.
76. Dunlop, J.; McIlvain, H. B.; Carrick, T. A.; Jow, B.; Lu, Q.; Kowal, D.; Lin, S.; Greenfield, A.; Grosanu, C.; Fan, K.; Petroski, R.; Williams, J.; Foster, A.; Butera, J. Characterization of novel aryl-ether, biaryl, and fluorene aspartic acid and diaminopropionic acid analogs as potent inhibitors of the high-affinity glutamate transporter EAAT2. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 974-82.
77. Jensen, A. A.; Erichsen, M. N.; Nielsen, C. W.; Stensbol, T. B.; Kehler, J.; Bunch, L. Discovery of the first selective inhibitor of excitatory amino acid transporter subtype 1. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 912-5.
78. Erichsen, M. N.; Huynh, T. H.; Abrahamsen, B.; Bastlund, J. F.; Bundgaard, C.; Monrad, O.; Bekker-Jensen, A.; Nielsen, C. W.; Frydenvang, K.; Jensen, A. A.; Bunch, L. Structure-activity relationship study of first selective inhibitor of excitatory amino acid transporter subtype 1: 2-Amino-4-(4-methoxyphenyl)-7-(naphthalen-1-yl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chromene-3-carbonitrile (UCPH-101). *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7180-91.
79. Huynh, T. H.; Shim, I.; Bohr, H.; Abrahamsen, B.; Nielsen, B.; Jensen, A. A.; Bunch, L. Structure-Activity Relationship Study of Selective Excitatory Amino Acid Transporter Subtype 1 (EAAT1) Inhibitor 2-Amino-4-(4-methoxyphenyl)-7-(naphthalen-1-yl)-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chromene-3-carbonitrile (UCPH-101) and Absolute Configurational Assignment Using Infrared and Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy in Combination with ab Initio Hartree-Fock Calculations. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5403-12.
80. Rothstein, J. D.; Patel, S.; Regan, M. R.; Haenggeli, C.; Huang, Y. H.; Bergles, D. E.; Jin, L.; Dykes Hoberg, M.; Vidensky, S.; Chung, D. S.; Toan, S. V.; Bruijn, L. I.; Su, Z. Z.; Gupta, P.; Fisher, P. B. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* **2005**, *433*, 73-7.
81. Adolph, O.; Koster, S.; Rath, M.; Georgieff, M.; Weigt, H. U.; Engele, J.; Senftleben, U.; Fohr, K. J. Rapid increase of glial glutamate uptake via blockade of the protein kinase A pathway. *Glia* **2007**, *55*, 1699-1707.
82. Do, S. H.; Fang, H. Y.; Ham, B. M.; Zuo, Z. The effects of lidocaine on the activity of glutamate transporter EAAT3: the role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase. *Anesth. Analg.* **2002**, *95*, 1263-1268.
83. Do, S. H.; Ham, B. M.; Zuo, Z. Effects of propofol on the activity of rat glutamate transporter type 3 expressed in *Xenopus* oocytes: the role of protein kinase C. *Neurosci. Lett.* **2003**, *343*, 113-116.
84. Lee, G.; Huang, Y.; Washington, J. M.; Briggs, N. W.; Zuo, Z. Carbamazepine enhances the activity of glutamate transporter type 3 via phosphatidylinositol 3-kinase. *Epilepsy Res.* **2005**, *66*, 145-53.
85. Yun, J. Y.; Park, K. S.; Kim, J. H.; Do, S. H.; Zuo, Z. Propofol reverses oxidative stress-attenuated glutamate transporter EAAT3 activity: evidence of protein kinase C involvement. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *565*, 83-8.
86. Ryu, J.; Cheong, I. Y.; Do, S. H.; Zuo, Z. Alphaxalone, a neurosteroid anaesthetic, increases the activity of the glutamate transporter type 3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **2009**, *602*, 23-7.
87. Fumagalli, E.; Funicello, M.; Rauen, T.; Gobbi, M.; Mennini, T. Riluzole enhances the activity of glutamate transporters GLAST, GLT1 and EAAC1. *Eur. J. Pharmacol.* **2008**, *578*, 171-6.

88. Grewer, C.; Gameiro, A.; Zhang, Z.; Tao, Z.; Braams, S.; Rauen, T. Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 609-19.
89. Berl, S.; Nicklas, W. J.; Clarke, D. D. Compartmentation of Glutamic Acid Metabolism in Brain Slices. *J. Neurochem.* **1968**, *15*, 131-140.
90. McKenna, M. C. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 3347-58.
91. Meister, A. Glutamine synthetase from mammalian tissues. *Methods Enzymol.* **1985**, *113*, 185-99.
92. Matthews, G. D.; Gould, R. M.; Vardimon, L. A single glutamine synthetase gene produces tissue-specific subcellular localization by alternative splicing. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 5527-34.
93. Martinezhernandez, A.; Bell, K. P.; Norenberg, M. D. Glutamine synthase- Glial localization in brain. *Science* **1977**, *195*, 1356-1358.
94. Shen, J.; Petersen, K. F.; Behar, K. L.; Brown, P.; Nixon, T. W.; Mason, G. F.; Petroff, O. A.; Shulman, G. I.; Shulman, R. G.; Rothman, D. L. Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8235-40.
95. Behar, K. L.; Rothman, D. L. In vivo nuclear magnetic resonance studies of glutamate-gamma-aminobutyric acid-glutamine cycling in rodent and human cortex: the central role of glutamine. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 2498S-504S; discussion 2523S-4S.
96. Kanamori, K.; Ross, B. D.; Kondrat, R. W. Glial uptake of neurotransmitter glutamate from the extracellular fluid studied in vivo by microdialysis and (¹³C) NMR. *J. Neurochem.* **2002**, *83*, 682-95.
97. Sundberg, B. E.; Waag, E.; Jacobsson, J. A.; Stephansson, O.; Rumaks, J.; Svirkis, S.; Alsio, J.; Roman, E.; Ebendal, T.; Klusa, V.; Fredriksson, R. The evolutionary history and tissue mapping of amino acid transporters belonging to solute carrier families SLC32, SLC36, and SLC38. *J. Mol. Neurosci.* **2008**, *35*, 179-93.
98. Varoqui, H.; Zhu, H.; Yao, D.; Ming, H.; Erickson, J. D. Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 4049-54.
99. Chaudhry, F. A.; Reimer, R. J.; Edwards, R. H. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 349-55.
100. Mackenzie, B.; Schafer, M. K.; Erickson, J. D.; Hediger, M. A.; Weihe, E.; Varoqui, H. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 23720-30.
101. Broer, A.; Albers, A.; Setiawan, I.; Edwards, R. H.; Chaudhry, F. A.; Lang, F.; Wagner, C. A.; Broer, S. Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *J. Physiol.* **2002**, *539*, 3-14.
102. Hagglund, M. G.; Sreedharan, S.; Nilsson, V. C.; Shaik, J. H.; Almkvist, I. M.; Backlin, S.; Wrange, O.; Fredriksson, R. Identification of SLC38A7 (SNAT7) protein as a glutamine transporter expressed in neurons. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 20500-11.
103. Kanai, Y.; Segawa, H.; Miyamoto, K.; Uchino, H.; Takeda, E.; Endou, H. Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23629-32.
104. Bak, L. K.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 641-653.
105. Kvamme, E.; Torgner, I. A.; Roberg, B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66*, 951-8.
106. Chan, P. H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **1996**, *27*, 1124-9.
107. Dringen, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* **2000**, *62*, 649-671.
108. Chen, Y.; Swanson, R. A. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2003**, *23*, 137-49.
109. Ramonet, D.; Rodriguez, M. J.; Fredriksson, K.; Bernal, F.; Mahy, N. In vivo neuroprotective adaptation of the glutamate/glutamine cycle to neuronal death. *Hippocampus* **2004**, *14*, 586-94.

110. Bacci, A.; Sancini, G.; Verderio, C.; Armano, S.; Pravettoni, E.; Fesce, R.; Franceschetti, S.; Matteoli, M. Block of glutamate-glutamine cycle between astrocytes and neurons inhibits epileptiform activity in hippocampus. *J. Neurophysiol.* **2002**, *88*, 2302-2310.
111. Kegeles, L. S.; Mao, X.; Stanford, A. D.; Girgis, R.; Ojeil, N.; Xu, X.; Gil, R.; Slifstein, M.; Abi-Dargham, A.; Lisanby, S. H.; Shungu, D. C. Elevated prefrontal cortex gamma-aminobutyric acid and glutamate-glutamine levels in schizophrenia measured in vivo with proton magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Gen. Psychiatry* **2012**, *69*, 449-59.
112. Schor, N. F. Inactivation of mammalian brain glutamine synthetase by oxygen radicals. *Brain Res.* **1988**, *456*, 17-21.
113. Butterfield, D. A.; Hensley, K.; Cole, P.; Subramaniam, R.; Aksenov, M.; Aksenova, M.; Bummer, P. M.; Haley, B. E.; Carney, J. M. Oxidatively induced structural alteration of glutamine synthetase assessed by analysis of spin label incorporation kinetics: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **1997**, *68*, 2451-7.
114. Edwards, R. H.; Bellocchio, E. E.; Reimer, R. J.; Freneau, R. T. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **2000**, *289*, 957-960.
115. Gasnier, B. The loading of neurotransmitters into synaptic vesicles. *Biochimie* **2000**, *82*, 327-337.
116. Takamori, S.; Rhee, J. S.; Rosenmund, C.; Jahn, R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* **2000**, *407*, 189-94.
117. Ni, B. H.; Rosteck, P. R.; Nadi, N. S.; Paul, S. M. Cloning and Expression of a Cdna- Encoding a Brain-Specific Na⁺-Dependent Inorganic-Phosphate Cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5607-5611.
118. Edwards, R. H.; Bellocchio, E. E.; Hu, H. L.; Pohorille, A.; Chan, J.; Pickel, V. M. The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 8648-8659.
119. Aihara, Y.; Mashima, H.; Onda, H.; Hisano, S.; Kasuya, H.; Hori, T.; Yamada, S.; Tomura, H.; Yamada, Y.; Inoue, I.; Kojima, I.; Takeda, J. Molecular cloning of a novel brain-type Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* **2000**, *74*, 2622-2625.
120. Hisano, S.; Hoshi, K.; Ikeda, Y.; Maruyama, D.; Kanemoto, M.; Ichijo, H.; Kojima, I.; Takeda, J.; Nogami, H. Regional expression of a gene encoding a neuron-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) in the rat forebrain. *Mol. Brain Res.* **2000**, *83*, 34-43.
121. Fujiyama, F.; Furuta, T.; Kaneko, T. Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **2001**, *435*, 379-87.
122. Herzog, E.; Bellenchi, G. C.; Gras, C.; Bernard, V.; Ravassard, P.; Bedet, C.; Gasnier, B.; Giros, B.; El Mestikawy, S. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* **2001**, *21*, RC181.
123. Sakata-Haga, H.; Kanemoto, M.; Maruyama, D.; Hoshi, K.; Mogi, K.; Narita, M.; Okado, N.; Ikeda, Y.; Nogami, H.; Fukui, Y.; Kojima, I.; Takeda, J.; Hisano, S. Differential localization and colocalization of two neuron-types of sodium-dependent inorganic phosphate cotransporters in rat forebrain. *Brain Res.* **2001**, *902*, 143-55.
124. Takamori, S.; Rhee, J. S.; Rosenmund, C.; Jahn, R. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J. Neurosci.* **2001**, *21*, RC182.
125. Freneau, R. T., Jr.; Burman, J.; Qureshi, T.; Tran, C. H.; Proctor, J.; Johnson, J.; Zhang, H.; Sulzer, D.; Copenhagen, D. R.; Storm-Mathisen, J.; Reimer, R. J.; Chaudhry, F. A.; Edwards, R. H. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14488-93.
126. Gras, C.; Herzog, E.; Bellenchi, G. C.; Bernard, V.; Ravassard, P.; Pohl, M.; Gasnier, B.; Giros, B.; El Mestikawy, S. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5442-51.
127. Schafer, M. K.; Varoqui, H.; Defamie, N.; Weihe, E.; Erickson, J. D. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50734-48.
128. Takamori, S.; Malherbe, P.; Broger, C.; Jahn, R. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 798-803.

129. Omote, H.; Miyaji, T.; Juge, N.; Moriyama, Y. Vesicular Neurotransmitter Transporter: Bioenergetics and Regulation of Glutamate Transport. *Biochemistry* **2011**, *50*, 5558-5565.
130. Gasnier, B. The SLC32 transporter, a key protein for the synaptic release of inhibitory amino acids. *Pflügers Archiv* **2004**, *447*, 756-759.
131. Reimer, R. J.; Edwards, R. H. Organic anion transport is the primary function of the SLC17/type I phosphate transporter family. *Pflügers Archiv* **2004**, *447*, 629-635.
132. Miyaji, T.; Omote, H.; Moriyama, Y. Functional characterization of vesicular excitatory amino acid transport by human sialin. *J. Neurochem* **2011**, *119*, 1-5.
133. Sawada, K.; Echigo, N.; Juge, N.; Miyaji, T.; Hiasa, M.; Otsuka, M.; Omote, H.; Moriyama, Y. Identification and characterization of a vesicular nucleotide transporter. *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn* **2008**, *128*, 65-66.
134. Parsons, S. M. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J* **2000**, *14*, 2423-34.
135. Eiden, L. E.; Schafer, M. K.; Weihe, E.; Schutz, B. The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflügers Archiv* **2004**, *447*, 636-40.
136. Chaudhry, F. A.; Edwards, R. H.; Fonnum, F. Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2008**, *48*, 277-301.
137. Varoqui, H.; Erickson, J. D. Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27229-32.
138. Erickson, J. D.; Varoqui, H.; Schafer, M. K.; Modi, W.; Diebler, M. F.; Weihe, E.; Rand, J.; Eiden, L. E.; Bonner, T. I.; Usdin, T. B. Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21929-32.
139. Roghani, A.; Feldman, J.; Kohan, S. A.; Shirzadi, A.; Gundersen, C. B.; Brecha, N.; Edwards, R. H. Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10620-4.
140. Moriyama, Y.; Juge, N.; Muroyama, A.; Hiasa, M.; Omote, H. Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter Is a Cl(-)/gamma-Aminobutyrate Co-transporter. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 35073-35078.
141. Edwards, R. H.; Fremeau, R. T.; Troyer, M. D.; Pahner, I.; Nygaard, G. O.; Tran, C. H.; Reimer, R. J.; Bellocchio, E. E.; Fortin, D.; Storm-Mathisen, J. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* **2001**, *31*, 247-260.
142. Kaneko, T.; Fujiyama, F. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neurosci. Res.* **2002**, *42*, 243-50.
143. Kaneko, T.; Fujiyama, F.; Hioki, H. Immunohistochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **2002**, *444*, 39-62.
144. Hisano, S.; Sawada, K.; Kawano, M.; Kanemoto, M.; Xiong, G.; Mogi, K.; Sakata-Haga, H.; Takeda, J.; Fukui, Y.; Nogami, H. Expression of inorganic phosphate/vesicular glutamate transporters (BNPI/VGLUT1 and DNPI/VGLUT2) in the cerebellum and precerebellar nuclei of the rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2002**, *107*, 23-31.
145. Edwards, R. H.; Fremeau, R. T.; Voglmaier, S.; Seal, R. P. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci.* **2004**, *27*, 98-103.
146. Erickson, J. D.; Varoqui, H.; Schafer, M. K. H.; Zhu, H. M.; Weihe, E. Identification of the differentiation-associated Na⁺/P-I transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 142-155.
147. Herzog, E.; Takamori, S.; Jahn, R.; Brose, N.; Wojcik, S. M. Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J. Neurochem.* **2006**, *99*, 1011-8.
148. Nakamura, K.; Hioki, H.; Fujiyama, F.; Kaneko, T. Postnatal changes of vesicular glutamate transporter (VGLUT)1 and VGLUT2 immunoreactivities and their colocalization in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *492*, 263-88.
149. Liguz-Lecznar, M.; Skangiel-Kramska, J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol. Exp.* **2007**, *67*, 207-18.
150. Persson, S.; Boulland, J. L.; Aspling, M.; Larsson, M.; Fremeau, R. T., Jr.; Edwards, R. H.; Storm-Mathisen, J.; Chaudhry, F. A.; Broman, J. Distribution of vesicular glutamate transporters 1

- and 2 in the rat spinal cord, with a note on the spinocervical tract. *J. Comp. Neurol.* **2006**, 497, 683-701.
151. Boulland, J. L.; Qureshi, T.; Seal, R. P.; Rafiki, A.; Gundersen, V.; Bergersen, L. H.; Freneau, R. T., Jr.; Edwards, R. H.; Storm-Mathisen, J.; Chaudhry, F. A. Expression of the vesicular glutamate transporters during development indicates the widespread corelease of multiple neurotransmitters. *J. Comp. Neurol.* **2004**, 480, 264-80.
152. Dal Bo, G.; St-Gelais, F.; Danik, M.; Williams, S.; Cotton, M.; Trudeau, L. E. Dopamine neurons in culture express VGLUT2 explaining their capacity to release glutamate at synapses in addition to dopamine. *J. Neurochem.* **2004**, 88, 1398-405.
153. Trudeau, L. E. Glutamate co-transmission as an emerging concept in monoamine neuron function. *J. Psychiatry Neurosci.* **2004**, 29, 296-310.
154. Kawano, M.; Kawasaki, A.; Sakata-Haga, H.; Fukui, Y.; Kawano, H.; Nogami, H.; Hisano, S. Particular subpopulations of midbrain and hypothalamic dopamine neurons express vesicular glutamate transporter 2 in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **2006**, 498, 581-92.
155. Danik, M.; Cassoly, E.; Manseau, F.; Sotty, F.; Mouginot, D.; Williams, S. Frequent coexpression of the vesicular glutamate transporter 1 and 2 genes, as well as coexpression with genes for choline acetyltransferase or glutamic acid decarboxylase in neurons of rat brain. *J. Neurosci. Res.* **2005**, 81, 506-21.
156. Duguid, I. C.; Smart, T. G. Retrograde activation of presynaptic NMDA receptors enhances GABA release at cerebellar interneuron-Purkinje cell synapses. *Nature Neurosci.* **2004**, 7, 525-533.
157. Seal, R. P.; Edwards, R. H. The diverse roles of vesicular glutamate transporter 3. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, 137-50.
158. Herzog, E.; Gilchrist, J.; Gras, C.; Muzerelle, A.; Ravassard, P.; Giros, B.; Gaspar, P.; El Mestikawy, S. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* **2004**, 123, 983-1002.
159. Hisano, S. Vesicular glutamate transporters in the brain. *Anat. Sci. Int.* **2003**, 78, 191-204.
160. Li, J. L.; Xiong, K. H.; Dong, Y. L.; Fujiyama, F.; Kaneko, T.; Mizuno, N. Vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in the trigeminal ganglion neurons of the rat, with special reference to coexpression. *J. Comp. Neurol.* **2003**, 463, 212-20.
161. Li, J. L.; Fujiyama, F.; Kaneko, T.; Mizuno, N. Expression of vesicular glutamate transporters, VGLUT1 and VGLUT2, in axon terminals of nociceptive primary afferent fibers in the superficial layers of the medullary and spinal dorsal horns of the rat. *J. Comp. Neurol.* **2003**, 457, 236-49.
162. Oliveira, A. L.; Hydling, F.; Olsson, E.; Shi, T.; Edwards, R. H.; Fujiyama, F.; Kaneko, T.; Hokfelt, T.; Cullheim, S.; Meister, B. Cellular localization of three vesicular glutamate transporter mRNAs and proteins in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Synapse* **2003**, 50, 117-29.
163. Raab, M.; Neuhuber, W. L. Vesicular glutamate transporter 2 immunoreactivity in putative vagal mechanosensor terminals of mouse and rat esophagus: indication of a local effector function? *Cell Tissue Res.* **2003**, 312, 141-8.
164. Tong, Q.; Ma, J.; Kirchgeßner, A. L. Vesicular glutamate transporter 2 in the brain-gut axis. *Neuroreport* **2001**, 12, 3929-34.
165. Brouns, I.; Pintelon, I.; Van Genechten, J.; De Proost, I.; Timmermans, J. P.; Adriaensen, D. Vesicular glutamate transporter 2 is expressed in different nerve fibre populations that selectively contact pulmonary neuroepithelial bodies. *Histochem. Cell Biol.* **2004**, 121, 1-12.
166. Mimura, Y.; Mogi, K.; Kawano, M.; Fukui, Y.; Takeda, J.; Nogami, H.; Hisano, S. Differential expression of two distinct vesicular glutamate transporters in the rat retina. *Neuroreport* **2002**, 13, 1925-8.
167. Hayashi, M.; Yamada, H.; Uehara, S.; Morimoto, R.; Muroyama, A.; Yatsushiro, S.; Takeda, J.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y. Secretory granule-mediated co-secretion of L-glutamate and glucagon triggers glutamatergic signal transmission in islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 1966-74.
168. Morimoto, R.; Hayashi, M.; Yatsushiro, S.; Otsuka, M.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y. Co-expression of vesicular glutamate transporters (VGLUT1 and VGLUT2) and their association with synaptic-like microvesicles in rat pinealocytes. *J. Neurochem.* **2003**, 84, 382-91.

169. Redecker, P.; Kreutz, M. R.; Bockmann, J.; Gundelfinger, E. D.; Boeckers, T. M. Brain synaptic junctional proteins at the acrosome of rat testicular germ cells. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 809-19.
170. Hinoi, E.; Takarada, T.; Ueshima, T.; Tsuchihashi, Y.; Yoneda, Y. Glutamate signaling in peripheral tissues. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 1-13.
171. Hayashi, M.; Morimoto, R.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y. Expression and localization of vesicular glutamate transporters in pancreatic islets, upper gastrointestinal tract, and testis. *J. Histochem. Cytochem.* **2003**, *51*, 1375-90.
172. Gu, Y.; Publicover, S. J. Expression of functional metabotropic glutamate receptors in primary cultured rat osteoblasts. Cross-talk with N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34252-9.
173. Skerry, T. M.; Taylor, A. F. Glutamate signalling in bone. *Curr. Pharm. Des.* **2001**, *7*, 737-50.
174. Hinoi, E.; Fujimori, S.; Takarada, T.; Taniura, H.; Yoneda, Y. Facilitation of glutamate release by ionotropic glutamate receptors in osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 452-8.
175. Moriyama, Y.; Yamamoto, A. Vesicular L-glutamate transporter in microvesicles from bovine pineal glands. Driving force, mechanism of chloride anion activation, and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22314-20.
176. Gras, C.; Vinatier, J.; Amilhon, B.; Guerci, A.; Christov, C.; Ravassard, P.; Giros, B.; El Mestikawy, S. Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early post-natal life. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 901-11.
177. Miyazaki, T.; Fukaya, M.; Shimizu, H.; Watanabe, M. Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 2563-72.
178. Wojcik, S. M.; Rhee, J. S.; Herzog, E.; Sigler, A.; Jahn, R.; Takamori, S.; Brose, N.; Rosenmund, C. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 7158-63.
179. Moechars, D.; Weston, M. C.; Leo, S.; Callaerts-Vegh, Z.; Goris, I.; Daneels, G.; Buist, A.; Cik, M.; van der Spek, P.; Kass, S.; Meert, T.; D'Hooge, R.; Rosenmund, C.; Hampson, R. M. Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 12055-66.
180. Blaesse, P.; Ehrhardt, S.; Friauf, E.; Nothwang, H. G. Developmental pattern of three vesicular glutamate transporters in the rat superior olivary complex. *Cell Tissue Res.* **2005**, *320*, 33-50.
181. Gillespie, D. C.; Kim, G.; Kandler, K. Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. *Nature Neurosci.* **2005**, *8*, 332-8.
182. Fremeau, R. T., Jr.; Kam, K.; Qureshi, T.; Johnson, J.; Copenhagen, D. R.; Storm-Mathisen, J.; Chaudhry, F. A.; Nicoll, R. A.; Edwards, R. H. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* **2004**, *304*, 1815-9.
183. Tordera, R. M.; Totterdell, S.; Wojcik, S. M.; Brose, N.; Elizalde, N.; Lasheras, B.; Del Rio, J. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur. J. Neurosci.* **2007**, *25*, 281-290.
184. Seal, R. P.; Akil, O.; Yi, E.; Weber, C. M.; Grant, L.; Yoo, J.; Clause, A.; Kandler, K.; Noebels, J. L.; Glowatzki, E.; Lustig, L. R.; Edwards, R. H. Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* **2008**, *57*, 263-75.
185. Seal, R. P.; Wang, X.; Guan, Y.; Raja, S. N.; Woodbury, C. J.; Basbaum, A. I.; Edwards, R. H. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* **2009**, *462*, 651-655.
186. Naito, S.; Ueda, T. Characterization of Glutamate Uptake into Synaptic Vesicles. *J. Neurochem.* **1985**, *44*, 99-109.
187. Bai, L.; Xu, H.; Collins, J. F.; Ghishan, F. K. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 36764-9.
188. Carlson, M. D.; Kish, P. E.; Ueda, T. Characterization of the solubilized and reconstituted ATP-dependent vesicular glutamate uptake system. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 7369-76.

189. Juge, N.; Yoshida, Y.; Yatsushiro, S.; Omote, H.; Moriyama, Y. Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 39499-506.
190. Juge, N.; Gray, J. A.; Omote, H.; Miyaji, T.; Inoue, T.; Hara, C.; Uneyama, H.; Edwards, R. H.; Nicoll, R. A.; Moriyama, Y. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* **2010**, *68*, 99-112.
191. Ottersen, O. P. Quantitative electron microscopic immunocytochemistry of neuroactive amino acids. *Anat. Embryol.* **1989**, *180*, 1-15.
192. Attwell, D.; Barbour, B.; Szatkowski, M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* **1993**, *11*, 401-7.
193. Schenck, S.; Wojcik, S. M.; Brose, N.; Takamori, S. A chloride conductance in VGLUT1 underlies maximal glutamate loading into synaptic vesicles. *Nature Neurosci.* **2009**, *12*, 156-62.
194. El Mestikawy, S.; Wall, M.; Aring, G. M.; Descarries, L.; Trudeau, L.-E. From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nature Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 425.
195. Kraineva, J.; Narayanan, R. A.; Kondrashkina, E.; Thiyagarajan, P.; Winter, R. Kinetics of lamellar-to-cubic and inter-cubic phase transitions of pure and cytochrome c containing monoolein dispersions monitored by time-resolved small-angle X-ray diffraction. *Langmuir* **2005**, *21*, 3559-71.
196. Chaudhry, F. A.; Boulland, J. L.; Jenstad, M.; Bredahl, M. K.; Edwards, R. H. Pharmacology of neurotransmitter transport into secretory vesicles. *Handb. Exp. Pharmacol.* **2008**, *77*-106.
197. Edwards, R. H. The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* **2007**, *55*, 835-58.
198. Xie, X. S.; Crider, B. P.; Stone, D. K. Isolation and reconstitution of the chloride transporter of clathrin-coated vesicles. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18870-3.
199. Kawasaki, M.; Uchida, S.; Monkawa, T.; Miyawaki, A.; Mikoshiba, K.; Marumo, F.; Sasaki, S. Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* **1994**, *12*, 597-604.
200. Stobrawa, S. M.; Breiderhoff, T.; Takamori, S.; Engel, D.; Schweizer, M.; Zdebik, A. A.; Bosl, M. R.; Ruether, K.; Jahn, H.; Draguhn, A.; Jahn, R.; Jentsch, T. J. Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* **2001**, *29*, 185-96.
201. Sawada, K.; Echigo, N.; Juge, N.; Miyaji, T.; Otsuka, M.; Omote, H.; Yamamoto, A.; Moriyama, Y. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 5683-6.
202. Miyaji, T.; Echigo, N.; Hiasa, M.; Senoh, S.; Omote, H.; Moriyama, Y. Identification of a vesicular aspartate transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11720-4.
203. Iharada, M.; Miyaji, T.; Fujimoto, T.; Hiasa, M.; Anzai, N.; Omote, H.; Moriyama, Y. Type 1 sodium-dependent phosphate transporter (SLC17A1 Protein) is a Cl(-)-dependent urate exporter. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 26107-13.
204. Cheng, X. R.; Yang, Y.; Zhou, W. X.; Zhang, Y. X. Expression of VGLUTs contributes to degeneration and acquisition of learning and memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2011**, *95*, 361-75.
205. Garcia-Garcia, A. L.; Elizalde, N.; Matrov, D.; Harro, J.; Wojcik, S. M.; Venzala, E.; Ramirez, M. J.; Del Rio, J.; Tordera, R. M. Increased vulnerability to depressive-like behavior of mice with decreased expression of VGLUT1. *Biol. Psychiatry* **2009**, *66*, 275-82.
206. Zink, M.; Vollmayr, B.; Gebicke-Haerter, P. J.; Henn, F. A. Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression. *Neuropharmacology* **2010**, *58*, 465-73.
207. Wootz, H.; Enjin, A.; Wallen-Mackenzie, A.; Lindholm, D.; Kullander, K. Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol. Dis.* **2010**, *37*, 58-66.
208. Shen, Y.-C.; Liao, D.-L.; Lu, C.-L.; Chen, J.-Y.; Liou, Y.-J.; Chen, T.-T.; Chen, C.-H. Resequencing of the vesicular glutamate transporter 2 gene (VGLUT2) reveals some rare genetic variants that may increase the genetic burden in schizophrenia. *Schizophr. Res.* **2010**, *121*, 179-186.
209. Rueda, N.; Llorens-Martin, M.; Florez, J.; Valdizan, E.; Banerjee, P.; Trejo, J. L.; Martinez-Cue, C. Memantine normalizes several phenotypic features in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Alzheimers Dis.* **2010**, *21*, 277-90.
210. Kashani, A.; Lepicard, E.; Poirel, O.; Videau, C.; David, J. P.; Fallet-Bianco, C.; Simon, A.; Delacourte, A.; Giros, B.; Epelbaum, J.; Betancur, C.; El Mestikawy, S. Loss of VGLUT1 and

- VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **2008**, 29, 1619-1630.
211. Kirvell, S. L.; Esiri, M.; Francis, P. T. Down-regulation of vesicular glutamate transporters precedes cell loss and pathology in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2006**, 98, 939-50.
212. Kirvell, S. L.; Elliott, M. S.; Kalaria, R. N.; Hortobagyi, T.; Ballard, C. G.; Francis, P. T. Vesicular glutamate transporter and cognition in stroke: a case-control autopsy study. *Neurology* **2010**, 75, 1803-9.
213. Bell, K. F. S.; Bennett, D. A.; Cuello, A. C. Paradoxical Upregulation of Glutamatergic Presynaptic Boutons during Mild Cognitive Impairment. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 10810-10817.
214. Sokolow, S.; Luu, S. H.; Nandy, K.; Miller, C. A.; Vinters, H. V.; Poon, W. W.; Gylys, K. H. Preferential accumulation of amyloid-beta in presynaptic glutamatergic terminals (VGLUT1 and VGLUT2) in Alzheimer's disease cortex. *Neurobiol. Dis.* **2012**, 45, 381-7.
215. Maurer, K.; Volk, S.; Gerbaldo, H. Auguste D and Alzheimer's disease. *Lancet* **1997**, 349, 1546-9.
216. Helmer, C.; Pasquier, F.; Dartigues, J.-F. Épidémiologie de la maladie d'Alzheimer et des syndromes apparentés. *Med. Sci. (Paris)* **2006**, 22, 288-296.
217. Hirtz, D.; Thurman, D. J.; Gwinn-Hardy, K.; Mohamed, M.; Chaudhuri, A. R.; Zalutsky, R. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* **2007**, 68, 326-37.
218. Hebert, L. E.; Scherr, P. A.; Bienias, J. L.; Bennett, D. A.; Evans, D. A. Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Arch. Neurol.* **2003**, 60, 1119-22.
219. Querfurth, H. W.; LaFerla, F. M. Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.* **2010**, 362, 329-44.
220. Haass, C.; Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, 8, 101-12.
221. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol. Rev.* **2001**, 81, 741-766.
222. Busciglio, J.; Pelsman, A.; Wong, C.; Pigino, G.; Yuan, M.; Mori, H.; Yankner, B. A. Altered metabolism of the amyloid beta precursor protein is associated with mitochondrial dysfunction in Down's syndrome. *Neuron* **2002**, 33, 677-88.
223. Tanzi, R. E.; Bertram, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* **2005**, 120, 545-55.
224. Klein, W. L.; Krafft, G. A.; Finch, C. E. Targeting small Abeta oligomers: the solution to an Alzheimer's disease conundrum? *Trends Neurosci.* **2001**, 24, 219-24.
225. Kaye, R.; Head, E.; Thompson, J. L.; McIntire, T. M.; Milton, S. C.; Cotman, C. W.; Glabe, C. G. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **2003**, 300, 486-9.
226. Walsh, D. M.; Townsend, M.; Podlisny, M. B.; Shankar, G. M.; Fadeeva, J. V.; El Agnaf, O.; Hartley, D. M.; Selkoe, D. J. Certain inhibitors of synthetic amyloid beta-peptide (Abeta) fibrillogenesis block oligomerization of natural Abeta and thereby rescue long-term potentiation. *J. Neurosci.* **2005**, 25, 2455-2462.
227. Walsh, D. M.; Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J. Neurochem.* **2007**, 101, 1172-84.
228. Klyubin, I.; Betts, V.; Welzel, A. T.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Wallin, A.; Lemere, C. A.; Cullen, W. K.; Peng, Y.; Wisniewski, T.; Selkoe, D. J.; Anwyl, R.; Walsh, D. M.; Rowan, M. J. Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J. Neurosci.* **2008**, 28, 4231-7.
229. Lue, L. F.; Kuo, Y. M.; Roher, A. E.; Brachova, L.; Shen, Y.; Sue, L.; Beach, T.; Kurth, J. H.; Rydel, R. E.; Rogers, J. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* **1999**, 155, 853-62.
230. Kamenetz, F.; Tomita, T.; Hsieh, H.; Seabrook, G.; Borchelt, D.; Iwatsubo, T.; Sisodia, S.; Malinow, R. APP processing and synaptic function. *Neuron* **2003**, 37, 925-37.
231. Kanemitsu, H.; Tomiyama, T.; Mori, H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci. Lett.* **2003**, 350, 113-6.
232. Farris, W.; Mansourian, S.; Chang, Y.; Lindsley, L.; Eckman, E. A.; Frosch, M. P.; Eckman, C. B.; Tanzi, R. E.; Selkoe, D. J.; Guenette, S. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of

- insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 4162-7.
233. Russo, R.; Borghi, R.; Markesbery, W.; Tabaton, M.; Piccini, A. Neprilysin decreases uniformly in Alzheimer's disease and in normal aging. *FEBS Lett.* **2005**, 579, 6027-30.
234. Hellstrom-Lindahl, E.; Ravid, R.; Nordberg, A. Age-dependent decline of neprilysin in Alzheimer's disease and normal brain: inverse correlation with A beta levels. *Neurobiol. Aging* **2008**, 29, 210-21.
235. Wang, D. S.; Iwata, N.; Hama, E.; Saido, T. C.; Dickson, D. W. Oxidized neprilysin in aging and Alzheimer's disease brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 310, 236-241.
236. Miners, J. S.; Baig, S.; Tayler, H.; Kehoe, P. G.; Love, S. Neprilysin and insulin-degrading enzyme levels are increased in Alzheimer disease in relation to disease severity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2009**, 68, 902-14.
237. Miners, J. S.; van Helmond, Z.; Kehoe, P. G.; Love, S. Changes with age in the activities of beta-secretase and the Abeta-degrading enzymes neprilysin, insulin-degrading enzyme and angiotensin-converting enzyme. *Brain Pathol.* **2010**, 20, 794-802.
238. Miners, J. S.; Barua, N.; Kehoe, P. G.; Gill, S.; Love, S. Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, 70, 944-59.
239. Proctor, C. J.; Pienaar, I. S.; Elson, J.; Kirkwood, T. B. Aggregation, impaired degradation and immunization targeting of amyloid-beta dimers in Alzheimer's disease: a stochastic modelling approach. *Mol. Neurodegener.* **2012**, 7, 32.
240. Lee, V. M.; Goedert, M.; Trojanowski, J. Q. Neurodegenerative tauopathies. *Annual Rev. Neurosci.* **2001**, 24, 1121-59.
241. Iqbal, K.; Alonso Adel, C.; Chen, S.; Chohan, M. O.; El-Akkad, E.; Gong, C. X.; Khatoon, S.; Li, B.; Liu, F.; Rahman, A.; Tanimukai, H.; Grundke-Iqbal, I. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 198-210.
242. Santacruz, K.; Lewis, J.; Spire, T.; Paulson, J.; Kotilinek, L.; Ingelsson, M.; Guimaraes, A.; DeTure, M.; Ramsden, M.; McGowan, E.; Forster, C.; Yue, M.; Orne, J.; Janus, C.; Mariash, A.; Kuskowski, M.; Hyman, B.; Hutton, M.; Ashe, K. H. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* **2005**, 309, 476-481.
243. Khlistunova, I.; Biernat, J.; Wang, Y.; Pickhardt, M.; von Bergen, M.; Gazova, Z.; Mandelkow, E.; Mandelkow, E. M. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 1205-1214.
244. Oddo, S.; Vasilevko, V.; Caccamo, A.; Kitazawa, M.; Cribbs, D. H.; LaFerla, F. M. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 39413-39423.
245. Andorfer, C.; Kress, Y.; Espinoza, M.; de Silva, R.; Tucker, K. L.; Barde, Y. A.; Duff, K.; Davies, P. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms. *J. Neurochem.* **2003**, 86, 582-590.
246. Lee, H. G.; Perry, G.; Moreira, P. I.; Garrett, M. R.; Liu, Q.; Zhu, X.; Takeda, A.; Nunomura, A.; Smith, M. A. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? *Trends Mol. Med.* **2005**, 11, 164-169.
247. Goedert, M.; Jakes, R. Mutations causing neurodegenerative tauopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1739, 240-250.
248. Gomez-Isla, T.; Hollister, R.; West, H.; Mui, S.; Growdon, J. H.; Petersen, R. C.; Parisi, J. E.; Hyman, B. T. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1997**, 41, 17-24.
249. Wallin, A. K.; Blennow, K.; Andreasen, N.; Minthon, L. CSF biomarkers for Alzheimer's Disease: levels of beta-amyloid, tau, phosphorylated tau relate to clinical symptoms and survival. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* **2006**, 21, 131-138.
250. Gotz, J.; Chen, F.; van Dorpe, J.; Nitsch, R. M. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. *Science* **2001**, 293, 1491-1495.
251. Lewis, J.; Dickson, D. W.; Lin, W. L.; Chisholm, L.; Corral, A.; Jones, G.; Yen, S. H.; Sahara, N.; Skipper, L.; Yager, D.; Eckman, C.; Hardy, J.; Hutton, M.; McGowan, E. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* **2001**, 293, 1487-1491.

252. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J. D.; Murphy, M. P.; Golde, T. E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M. P.; Akbari, Y.; LaFerla, F. M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **2003**, 39, 409-421.
253. Rapoport, M.; Dawson, H. N.; Binder, L. I.; Vitek, M. P.; Ferreira, A. Tau is essential to beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 6364-6369.
254. Roberson, E. D.; Scarce-Levie, K.; Palop, J. J.; Yan, F.; Cheng, I. H.; Wu, T.; Gerstein, H.; Yu, G. Q.; Mucke, L. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* **2007**, 316, 750-754.
255. Lopez Salom, M.; Morelli, L.; Castano, E. M.; Soto, E. F.; Pasquini, J. M. Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **2000**, 62, 302-310.
256. Hoozemans, J. J.; Veerhuis, R.; Van Haastert, E. S.; Rozemuller, J. M.; Baas, F.; Eikelenboom, P.; Scheper, W. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2005**, 110, 165-172.
257. Selkoe, D. J. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* **2002**, 298, 789-791.
258. Scheff, S. W.; Price, D. A.; Schmitt, F. A.; DeKosky, S. T.; Mufson, E. J. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* **2007**, 68, 1501-1508.
259. Masliah, E.; Mallory, M.; Alford, M.; DeTeresa, R.; Hansen, L. A.; McKeel, D. W., Jr.; Morris, J. C. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology* **2001**, 56, 127-129.
260. Davies, C. A.; Mann, D. M.; Sumpter, P. Q.; Yates, P. O. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **1987**, 78, 151-164.
261. Dekosky, S. T.; Scheff, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* **1990**, 27, 457-464.
262. Terry, R. D.; Masliah, E.; Salmon, D. P.; Butters, N.; DeTeresa, R.; Hill, R.; Hansen, L. A.; Katzman, R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **1991**, 30, 572-580.
263. Masliah, E.; Crews, L.; Hansen, L. Synaptic remodeling during aging and in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2006**, 9, 91-99.
264. Lister, J. P.; Barnes, C. A. Neurobiological changes in the hippocampus during normative aging. *Arch. Neurol.* **2009**, 66, 829-833.
265. Chapman, P. F.; White, G. L.; Jones, M. W.; Cooper-Blacketer, D.; Marshall, V. J.; Irizarry, M.; Younkin, L.; Good, M. A.; Bliss, T. V.; Hyman, B. T.; Younkin, S. G.; Hsiao, K. K. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neurosci.* **1999**, 2, 271-276.
266. Shankar, G. M.; Bloodgood, B. L.; Townsend, M.; Walsh, D. M.; Selkoe, D. J.; Sabatini, B. L. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J. Neurosci.* **2007**, 27, 2866-2875.
267. Snyder, E. M.; Nong, Y.; Almeida, C. G.; Paul, S.; Moran, T.; Choi, E. Y.; Nairn, A. C.; Salter, M. W.; Lombroso, P. J.; Gouras, G. K.; Greengard, P. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nature Neurosci.* **2005**, 8, 1051-1058.
268. Mucke, L.; Masliah, E.; Yu, G. Q.; Mallory, M.; Rockenstein, E. M.; Tatsuno, G.; Hu, K.; Kholodenko, D.; Johnson-Wood, K.; McConlogue, L. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* **2000**, 20, 4050-4058.
269. Cooper, J. D.; Salehi, A.; Delcroix, J. D.; Howe, C. L.; Belichenko, P. V.; Chua-Couzens, J.; Kilbridge, J. F.; Carlson, E. J.; Epstein, C. J.; Mobley, W. C. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 10439-44.
270. Tuszynski, M. H. Nerve growth factor gene therapy in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2007**, 21, 179-189.
271. Connor, B.; Young, D.; Yan, Q.; Faull, R. L.; Synek, B.; Dragunow, M. Brain-derived neurotrophic factor is reduced in Alzheimer's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **1997**, 49, 71-81.

272. Garzon, D. J.; Fahnestock, M. Oligomeric amyloid decreases basal levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA via specific downregulation of BDNF transcripts IV and V in differentiated human neuroblastoma cells. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 2628-2635.
273. Maelicke, A.; Samochocki, M.; Jostock, R.; Fehrenbacher, A.; Ludwig, J.; Albuquerque, E. X.; Zerlin, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* **2001**, *49*, 279-288.
274. Ikonomic, M. D.; Wecker, L.; Abrahamson, E. E.; Wu, J.; Counts, S. E.; Ginsberg, S. D.; Mufson, E. J.; Dekosky, S. T. Cortical alpha7 nicotinic acetylcholine receptor and beta-amyloid levels in early Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2009**, *66*, 646-651.
275. Wang, H. Y.; Lee, D. H.; D'Andrea, M. R.; Peterson, P. A.; Shank, R. P.; Reitz, A. B. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 5626-5632.
276. Nitsch, R. M. From acetylcholine to amyloid: neurotransmitters and the pathology of Alzheimer's disease. *Neurodegeneration* **1996**, *5*, 477-482.
277. Caccamo, A.; Oddo, S.; Billings, L. M.; Green, K. N.; Martinez-Coria, H.; Fisher, A.; LaFerla, F. M. M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. *Neuron* **2006**, *49*, 671-682.
278. Bitner, R. S.; Nikkel, A. L.; Markosyan, S.; Otte, S.; Puttfarcken, P.; Gopalakrishnan, M. Selective alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation regulates glycogen synthase kinase3beta and decreases tau phosphorylation in vivo. *Brain Res.* **2009**, *1265*, 65-74.
279. Bodick, N. C.; Offen, W. W.; Shannon, H. E.; Satterwhite, J.; Lucas, R.; van Lier, R.; Paul, S. M. The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **1997**, *11* Suppl 4, S16-22.
280. Nitsch, R. M.; Deng, M.; Tennis, M.; Schoenfeld, D.; Growdon, J. H. The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **2000**, *48*, 913-918.
281. Masliah, E.; Alford, M.; DeTeresa, R.; Mallory, M.; Hansen, L. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **1996**, *40*, 759-766.
282. Jacob, C. P.; Koutsilieri, E.; Bartl, J.; Neuen-Jacob, E.; Arzberger, T.; Zander, N.; Ravid, R.; Roggendorf, W.; Riederer, P.; Grunblatt, E. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2007**, *11*, 97-116.
283. Scott, H. A.; Gebhardt, F. M.; Mitrovic, A. D.; Vandenberg, R. J.; Dodd, P. R. Glutamate transporter variants reduce glutamate uptake in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2011**, *32*, 553 e1-11.
284. Robinson, S. R. Changes in the cellular distribution of glutamine synthetase in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* **2001**, *66*, 972-980.
285. Parihar, M. S.; Brewer, G. J. Mitochondrial failure in Alzheimer disease. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **2007**, *292*, C8-23.
286. Matos, M.; Augusto, E.; Oliveira, C. R.; Agostinho, P. Amyloid-beta peptide decreases glutamate uptake in cultured astrocytes: involvement of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase cascades. *Neuroscience* **2008**, *156*, 898-910.
287. Greenamyre, J. T.; Maragos, W. F.; Albin, R. L.; Penney, J. B.; Young, A. B. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psych.* **1988**, *12*, 421-430.
288. Dong, X. X.; Wang, Y.; Qin, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **2009**, *30*, 379-387.
289. Vosler, P. S.; Brennan, C. S.; Chen, J. Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* **2008**, *38*, 78-100.
290. Alberdi, E.; Sanchez-Gomez, M. V.; Cavaliere, F.; Perez-Samartin, A.; Zugaza, J. L.; Trullas, R.; Domercq, M.; Matute, C. Amyloid beta oligomers induce Ca²⁺ dysregulation and neuronal death through activation of ionotropic glutamate receptors. *Cell calcium* **2010**, *47*, 264-272.
291. Ulas, J.; Weihmuller, F. B.; Brunner, L. C.; Joyce, J. N.; Marshall, J. F.; Cotman, C. W. Selective increase of NMDA-sensitive glutamate binding in the striatum of Parkinson's disease,

- Alzheimer's disease, and mixed Parkinson's disease/Alzheimer's disease patients: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* **1994**, 14, 6317-6324.
292. Ikonomic, M. D.; Mizukami, K.; Warde, D.; Sheffield, R.; Hamilton, R.; Wenthold, R. J.; Armstrong, D. M. Distribution of glutamate receptor subunit NMDAR1 in the hippocampus of normal elderly and patients with Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* **1999**, 160, 194-204.
293. Sze, C.; Bi, H.; Kleinschmidt-DeMasters, B. K.; Filley, C. M.; Martin, L. J. N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **2001**, 182, 151-159.
294. Hynd, M. R.; Scott, H. L.; Dodd, P. R. Selective loss of NMDA receptor NR1 subunit isoforms in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2004**, 89, 240-247.
295. Hynd, M. R.; Scott, H. L.; Dodd, P. R. Differential expression of N-methyl-D-aspartate receptor NR2 isoforms in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2004**, 90, 913-919.
296. Panegyres, P. K.; Mamotte, C. D.; Vasikaran, S. D.; Wilton, S.; Fabian, V.; Kakulas, B. A. Butyrylcholinesterase K variant and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **1999**, 246, 369-370.
297. Williams, C.; Mehrian Shai, R.; Wu, Y.; Hsu, Y. H.; Sitzler, T.; Spann, B.; McCleary, C.; Mo, Y.; Miller, C. A. Transcriptome analysis of synaptoneurosome identifies neuroplasticity genes overexpressed in incipient Alzheimer's disease. *PLoS one* **2009**, 4, 4936.
298. Pellegrini-Giampietro, D. E.; Bennett, M. V.; Zukin, R. S. AMPA/kainate receptor gene expression in normal and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroscience* **1994**, 61, 41-9.
299. Yasuda, R. P.; Ikonomic, M. D.; Sheffield, R.; Rubin, R. T.; Wolfe, B. B.; Armstrong, D. M. Reduction of AMPA-selective glutamate receptor subunits in the entorhinal cortex of patients with Alzheimer's disease pathology: a biochemical study. *Brain Res.* **1995**, 678, 161-167.
300. Dewar, D.; Chalmers, D. T.; Graham, D. I.; McCulloch, J. Glutamate metabotropic and AMPA binding sites are reduced in Alzheimer's disease: an autoradiographic study of the hippocampus. *Brain Res.* **1991**, 553, 58-64.
301. Revett, T. J.; Baker, G. B.; Jhamandas, J.; Kar, S. Glutamate system, amyloid ss peptides and tau protein: functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J. Psychiatry Neurosci.* **2012**, 37, in press.
302. Aronica, E.; Dickson, D. W.; Kress, Y.; Morrison, J. H.; Zukin, R. S. Non-plaque dystrophic dendrites in Alzheimer hippocampus: a new pathological structure revealed by glutamate receptor immunocytochemistry. *Neuroscience* **1998**, 82, 979-991.
303. Lee, H. G.; Ogawa, O.; Zhu, X.; O'Neill, M. J.; Petersen, R. B.; Castellani, R. J.; Ghanbari, H.; Perry, G.; Smith, M. A. Aberrant expression of metabotropic glutamate receptor 2 in the vulnerable neurons of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2004**, 107, 365-71.
304. Kornhuber, J.; Weller, M. Psychogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy. *Biol. Psychiatry* **1997**, 41, 135-144.
305. Doraiswamy, P. M. The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in Alzheimer's disease: therapeutic potential. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2003**, 3, 373-378.
306. Farlow, M. R. NMDA receptor antagonists. A new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *Geriatrics* **2004**, 59, 22-27.
307. Sonkusare, S. K.; Kaul, C. L.; Ramarao, P. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders--memantine, a new hope. *Pharmacol. Res.* **2005**, 51, 1-17.
308. Lipton, S. A.; Chen, H. S. Paradigm shift in NMDA receptor drug development. *Expert Opin. Ther. Targets* **2005**, 9, 427-429.
309. Wenk, G. L.; Parsons, C. G.; Danysz, W. Potential role of N-methyl-D-aspartate receptors as executors of neurodegeneration resulting from diverse insults: focus on memantine. *Behav. Pharmacol.* **2006**, 17, 411-424.
310. Herrmann, N.; Li, A.; Lanctot, K. Memantine in dementia: a review of the current evidence. *Expert Opin. Pharmacother.* **2011**, 12, 787-800.
311. Parsons, C. G.; Gillig, K. Memantine as an example of a fast, voltage-dependent, open channel N-methyl-D-aspartate receptor blocker. *Methods Mol. Biol.* **2007**, 403, 15-36.
312. Danysz, W.; Parsons, C. G. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine - searching for the connections. *Br. J. Pharmacol.* **2012**, 167, 324-352.
313. Tremblay, R.; Chakravarthy, B.; Hewitt, K.; Tauskela, J.; Morley, P.; Atkinson, T.; Durkin, J. P. Transient NMDA receptor inactivation provides long-term protection to cultured cortical neurons from a variety of death signals. *J. Neurosci.* **2000**, 20, 7183-7192.

314. Rao, V. L.; Dogan, A.; Todd, K. G.; Bowen, K. K.; Dempsey, R. J. Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* **2001**, 911, 96-100.
315. Miguel-Hidalgo, J. J.; Alvarez, X. A.; Cacabelos, R.; Quack, G. Neuroprotection by memantine against neurodegeneration induced by beta-amyloid(1-40). *Brain Res.* **2002**, 958, 210-221.
316. Floden, A. M.; Li, S.; Combs, C. K. Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J. Neurosci.* **2005**, 25, 2566-2575.
317. Song, M. S.; Rauw, G.; Baker, G. B.; Kar, S. Memantine protects rat cortical cultured neurons against beta-amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, 28, 1989-2002.
318. Rammes, G.; Hasenjager, A.; Sroka-Saidi, K.; Deussing, J. M.; Parsons, C. G. Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of beta-amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology* **2011**, 60, 982-990.
319. Minkeviciene, R.; Banerjee, P.; Tanila, H. Memantine improves spatial learning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 311, 677-682.
320. Van Dam, D.; De Deyn, P. P. Cognitive evaluation of disease-modifying efficacy of galantamine and memantine in the APP23 model. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2006**, 16, 59-69.
321. Martinez-Coria, H.; Green, K. N.; Billings, L. M.; Kitazawa, M.; Albrecht, M.; Rammes, G.; Parsons, C. G.; Gupta, S.; Banerjee, P.; LaFerla, F. M. Memantine improves cognition and reduces Alzheimer's-like neuropathology in transgenic mice. *Am. J. Pathol.* **2010**, 176, 870-880.
322. Lipton, S. A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nature Rev. Neurosci.* **2007**, 8, 803-808.
323. Weinstock, M.; Luques, L.; Poltyrev, T.; Bejar, C.; Shoham, S. Ladostigil prevents age-related glial activation and spatial memory deficits in rats. *Neurobiol. Aging* **2011**, 32, 1069-78.
324. de Souza, L. C.; Lamari, F.; Belliard, S.; Jardel, C.; Houillier, C.; De Paz, R.; Dubois, B.; Sarazin, M. Cerebrospinal fluid biomarkers in the differential diagnosis of Alzheimer's disease from other cortical dementias. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2011**, 82, 240-6.
325. Chintamaneni, M.; Bhaskar, M. Biomarkers in Alzheimer's disease: a review. *ISRN Pharmacol.* **2012**, 2012, 984786.
326. Chetelat, G.; Desgranges, B.; de la Sayette, V.; Viader, F.; Eustache, F.; Baron, J. C. Mapping gray matter loss with voxel-based morphometry in mild cognitive impairment. *Neuroreport* **2002**, 13, 1939-1943.
327. Whitwell, J. L.; Przybelski, S. A.; Weigand, S. D.; Knopman, D. S.; Boeve, B. F.; Petersen, R. C.; Jack, C. R. 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain* **2007**, 130, 1777-1786.
328. Whitwell, J. L.; Shiung, M. M.; Przybelski, S. A.; Weigand, S. D.; Knopman, D. S.; Boeve, B. F.; Petersen, R. C.; Jack, C. R. MRI patterns of atrophy associated with progression to AD in amnesic mild cognitive impairment. *Neurology* **2008**, 70, 512-520.
329. Ewers, M.; Teipel, S. J.; Dietrich, O.; Schonberg, S. O.; Jessen, F.; Heun, R.; Scheltens, P.; van de Pol, L.; Freymann, N. R.; Moeller, H. J.; Hampel, H. Multicenter assessment of reliability of cranial MRI. *Neurobiol. Aging* **2006**, 27, 1051-9.
330. Hampel, H.; Frank, R.; Broich, K.; Teipel, S. J.; Katz, R. G.; Hardy, J.; Herholz, K.; Bokde, A. L. W.; Jessen, F.; Hoessler, Y. C.; Sanhai, W. R.; Zetterberg, H.; Woodcock, J.; Blennow, K. Biomarkers for Alzheimer's disease: academic, industry and regulatory perspectives. *Nature Rev. Drug Discov.* **2010**, 9, 560-574.
331. Bokde, A. L.; Karmann, M.; Teipel, S. J.; Born, C.; Lieb, M.; Reiser, M. F.; Moller, H. J.; Hampel, H. Decreased activation along the dorsal visual pathway after a 3-month treatment with galantamine in mild Alzheimer disease: a functional magnetic resonance imaging study. *J. Clin. Psychopharmacol.* **2009**, 29, 147-56.
332. Moffett, J. R.; Ross, B.; Arun, P.; Madhavarao, C. N.; Namboodiri, A. M. N-Acetylaspartate in the CNS: from neurodiagnostics to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* **2007**, 81, 89-131.
333. Kantarci, K. 1H magnetic resonance spectroscopy in dementia. *Brit. J. Radiol.* **2007**, 80 Spec No 2, S146-52.

334. Klunk, W. E.; Engler, H.; Nordberg, A.; Wang, Y.; Blomqvist, G.; Holt, D. P.; Bergstrom, M.; Savitcheva, I.; Huang, G. F.; Estrada, S.; Ausen, B.; Debnath, M. L.; Barletta, J.; Price, J. C.; Sandell, J.; Lopresti, B. J.; Wall, A.; Koivisto, P.; Antoni, G.; Mathis, C. A.; Langstrom, B. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* **2004**, *55*, 306-319.
335. Jack, C. R.; Lowe, V. J.; Senjem, M. L.; Weigand, S. D.; Kemp, B. J.; Shiung, M. M.; Knopman, D. S.; Boeve, B. F.; Klunk, W. E.; Mathis, C. A.; Petersen, R. C. C-II PiB and structural MRI provide complementary information in imaging of Alzheimers disease and amnesic mild cognitive impairment. *Brain* **2008**, *131*, 665-680.
336. Rowe, C. C.; Ackerman, U.; Browne, W.; Mulligan, R.; Pike, K. L.; O'Keefe, G.; Tochon-Danguy, H.; Chan, G.; Berlangieri, S. U.; Jones, G.; Dickinson-Rowe, K. L.; Kung, H. P.; Zhang, W.; Kung, M. P.; Skovronsky, D.; Dyrks, T.; Holl, G.; Krause, S.; Friebe, M.; Lehman, L.; Lindemann, S.; Dinkelborg, L. M.; Masters, C. L.; Villemagne, V. L. Imaging of amyloid beta in Alzheimer's disease with 18F-BAY94-9172, a novel PET tracer: proof of mechanism. *Lancet Neurol.* **2008**, *7*, 129-35.
337. Maycox, P. R.; Deckwerth, T.; Hell, J. W.; Jahn, R. Glutamate uptake by brain synaptic vesicles. Energy dependence of transport and functional reconstitution in proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 15423-15428.
338. Fykse, E. M.; Christensen, H.; Fonnum, F. Comparison of the properties of gamma-aminobutyric acid and L-glutamate uptake into synaptic vesicles isolated from rat brain. *J. Neurochem.* **1989**, *52*, 946-951.
339. Bridges, R. J.; Lovering, F. E.; Koch, H.; Cotman, C. W.; Chamberlin, A. R. A conformationally constrained competitive inhibitor of the sodium-dependent glutamate transporter in forebrain synaptosomes: L-anti-endo-3,4-methanopyrrolidine dicarboxylate. *Neurosci. Lett.* **1994**, *174*, 193-197.
340. Garlin, A. B.; Sinor, A. D.; Sinor, J. D.; Jee, S. H.; Grinspan, J. B.; Robinson, M. B. Pharmacology of sodium-dependent high-affinity L-[3H]glutamate transport in glial cultures. *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 2572-2580.
341. Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Thompson, C. M.; Bridges, R. J. Substituted quinolines as inhibitors of L-glutamate transport into synaptic vesicles. *Neuropharmacology* **1998**, *37*, 839-46.
342. Thompson, C. M.; Davis, E.; Carrigan, C. N.; Cox, H. D.; Bridges, R. J.; Gerdes, J. M. Inhibitors of the glutamate vesicular transporter (VGLUT). *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2041-2056.
343. Winter, H. C.; Ueda, T. Glutamate uptake system in the presynaptic vesicle: glutamic acid analogs as inhibitors and alternate substrates. *Neurochem. Res.* **1993**, *18*, 79-85.
344. Ganong, A. H.; Lanthorn, T. H.; Cotman, C. W. Kynurenic acid inhibits synaptic and acidic amino acid-induced responses in the rat hippocampus and spinal cord. *Brain Res.* **1983**, *273*, 170-174.
345. Carrigan, C. N.; Esslinger, C. S.; Bartlett, R. D.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M. Quinoline-2,4-dicarboxylic acids: synthesis and evaluation as inhibitors of the glutamate vesicular transport system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2607-2612.
346. Carrigan, C. N.; Bartlett, R. D.; Esslinger, C. S.; Cybulski, K. A.; Tongcharoensirikul, P.; Bridges, R. J.; Thompson, C. M. Synthesis and in vitro pharmacology of substituted quinoline-2,4-dicarboxylic acids as inhibitors of vesicular glutamate transport. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2260-2276.
347. Roseth, S.; Fykse, E. M.; Fonnum, F. Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 96-103.
348. Roseth, S.; Fykse, E. M.; Fonnum, F. Uptake of L-glutamate into synaptic vesicles: competitive inhibition by dyes with biphenyl and amino- and sulphonic acid-substituted naphthyl groups. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *56*, 1243-1249.
349. Fonnum, F.; Fykse, E. M.; Roseth, S. Uptake of glutamate into synaptic vesicles. *Prog. Brain Res.* **1998**, *116*, 87-101.
350. Gegelashvili, G.; Schousboe, A. High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* **1997**, *52*, 6-15.

351. Tamura, Y.; Ozkan, E. D.; Bole, D. G.; Ueda, T. IPF, a vesicular uptake inhibitory protein factor, can reduce the Ca(2+)-dependent, evoked release of glutamate, GABA and serotonin. *J. Neurochem.* **2001**, 76, 1153-1164.
352. Hartinger, J.; Jahn, R. An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 23122-23127.
353. Carlson, M. D.; Kish, P. E.; Ueda, T. Glutamate uptake into synaptic vesicles: competitive inhibition by bromocriptine. *J. Neurochem.* **1989**, 53, 1889-94.
354. van Hilten, J. J.; Ramaker, C. C.; Stowe, R. L.; Ives, N. J. Bromocriptine versus levodopa in early Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* **2007**.
355. Bole, D. G.; Ueda, T. Inhibition of vesicular glutamate uptake by Rose Bengal-related compounds: Structure-activity relationship. *Neurochem. Res.* **2005**, 30, 363-369.
356. Pietrancosta, N.; Kessler, A.; Favre-Besse, F. C.; Triballeau, N.; Quentin, T.; Giros, B.; El Mestikawy, S.; Acher, F. C. Rose Bengal analogs and vesicular glutamate transporters (VGLUTs). *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 6922-6933.
357. Njus, D.; Kelley, P. M.; Harnadek, G. J. Bioenergetics of secretory vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, 853, 237-265.
358. Shioi, J.; Ueda, T. Artificially imposed electrical potentials drive L-glutamate uptake into synaptic vesicles of bovine cerebral cortex. *Biochem. J.* **1990**, 267, 63-68.
359. Tabb, J. S.; Kish, P. E.; Van Dyke, R.; Ueda, T. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 15412-15418.
360. Wolosker, H.; de Souza, D. O.; de Meis, L. Regulation of glutamate transport into synaptic vesicles by chloride and proton gradient. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11726-11731.
361. Stankoff, B.; Wang, Y.; Bottlaender, M.; Aigrot, M. S.; Dolle, F.; Wu, C.; Feinstein, D.; Huang, G. F.; Semah, F.; Mathis, C. A.; Klunk, W.; Gould, R. M.; Lubetzki, C.; Zalc, B. Imaging of CNS myelin by positron-emission tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 9304-9309.
362. Stankoff, B.; Freeman, L.; Aigrot, M. S.; Chardain, A.; Dolle, F.; Williams, A.; Galanaud, D.; Armand, L.; Lehericy, S.; Lubetzki, C.; Zalc, B.; Bottlaender, M. Imaging central nervous system myelin by positron emission tomography in multiple sclerosis using [methyl-(1)(1)C]-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole. *Ann. Neurol.* **2011**, 69, 673-680.
363. Markuszewski, R.; Diehl, H. The Infrared-Spectra and Structures of the 3 Solid Forms of Fluorescein and Related-Compounds. *Talanta* **1980**, 27, 937-946.
364. Anthoni, U.; Christophersen, C.; Nielsen, P. H.; Puschl, A.; Schaumburg, K. Structure of red and orange fluorescein. *Struct. Chem.* **1995**, 6, 161-165.
365. Vodolazkaya, N.; Shakhova, P.; McHedlov-Petrosyan, N. Acid-base and tautomeric equilibria of fluorescein dyes in water micellar solutions of zwitterionic sulfobetaine surfactant. *Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, 79, 1437-1445.
366. von Bayer, A. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1871**, 5, 255-259.
367. Orndorff, W. R.; Hemmer, A. J. Fluorescein and some of its derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **1927**, 49, 1272-1280.
368. Rose, R. E. Growth of the dyestuffs industry: The application of science to art. *J. Chem. Educ.* **1926**, 3, 973.
369. Sun, W. C.; Gee, K. R.; Klaubert, D. H.; Haugland, R. P. Synthesis of fluorinated fluoresceins. *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6469-6475.
370. Burdette, S. C.; Walkup, G. K.; Spingler, B.; Tsien, R. Y.; Lippard, S. J. Fluorescent sensors for Zn(2+) based on a fluorescein platform: synthesis, properties and intracellular distribution. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7831-7841.
371. Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Nagano, T. Improvement and biological applications of fluorescent probes for zinc, ZnAFs. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6555-6562.
372. Ueno, Y.; Jiao, G. S.; Burgess, K. Preparation of 5-and 6-carboxyfluorescein. *Synthesis* **2004**, 2591-2593.
373. Lukhtanov, E. A.; Vorobiev, A. V. Mild synthesis of asymmetric 2'-carboxyethyl-substituted fluoresceins. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2424-2427.
374. Ueno, T.; Urano, Y.; Setsukinai, K.; Takakusa, H.; Kojima, H.; Kikuchi, K.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S.; Nagano, T. Rational principles for modulating fluorescence properties of fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14079-14085.

375. Bennacef, I.; Tymciu, S.; Dhilly, M.; Lasne, M.-C.; Debruyne, D.; Perrio, C.; Barré, L. Synthesis and biological evaluation of novel fluoro and iodo quinoline carboxamides as potential ligands of NK-3 receptors for in vivo imaging studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 4533-4541.
376. Kung, H. F.; Newman, S.; Choi, S.-R.; Oya, S.; Hou, C.; Zhuang, Z.-P.; Acton, P. D.; Plössl, K.; Winkler, J.; Kung, M.-P. 2-(2-(Dimethylaminomethyl)phenoxy)-5-iodophenylamine: An Improved Serotonin Transporter Imaging Agent. *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5258-5264.
377. Stavber, S.; Jereb, M.; Zupan, M. Electrophilic Iodination of Organic Compounds Using Elemental Iodine or Iodides. *Synthesis* **2008**, 2008, 1487-1513.
378. Orito, K.; Hatakeyama, T.; Takeo, M.; Sugimoto, H.; Tokuda, M. Synthesis of 5-Iodobenzofurans and 6-Iodobenzopyrans via Direct Iodination with Mercury(II) Oxide-Iodine Reagent. *Synthesis* **1997**, 1997, 23-25.
379. Blackmore, I. J.; Boa, A. N.; Murray, E. J.; Dennis, M.; Woodward, S. A simple preparation of iodoarenes, iodoalkenes and iodoalkynes by reaction of organolithiums with 2,2,2-trifluoro-1-iodoethane. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6671-6672.
380. Olah, G. A.; Wang, Q.; Sandford, G.; Surya Prakash, G. K. Synthetic methods and reactions. 181. Iodination of deactivated aromatics with N-iodosuccinimide in trifluoromethanesulfonic acid (NIS-CF₃SO₃H) via in situ generated superelectrophilic iodine(I) trifluoromethanesulfonate. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3194-3195.
381. Sathiyapriya, R.; Karunakaran, R. J. A convenient procedure for the iodination of arenes. *J. Chem. Res.* **2006**, 2006, 575-576.
382. Narender, N.; Srinivasu, P.; Kulkarni, S. J.; Raghavan, K. V. REGIOSELECTIVE OXYIODINATION OF AROMATIC COMPOUNDS USING POTASSIUM IODIDE AND OXONE®. *Synthetic Commun.* **2002**, 32, 2319-2324.
383. Wing-Wah, S. Iodination of methoxyamphetamines with iodine and silver sulfate. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6223-6224.
384. Kraszkiewicz, L.; Sosnowski, M.; Skulski, L. Oxidative Iodination of Deactivated Arenes in Concentrated Sulfuric Acid with I₂/NaIO₄ and KI/NaIO₄ Iodinating Systems. *Synthesis* **2006**, 2006, 1195-1199.
385. Suzuki, H. Direct Iodination of Trimethylbenzoic Acids and Tetramethylbenzoic Acids with Iodine-Periodic Acid. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, 44, 2871-2873.
386. Pavlinac, J.; Zupan, M.; Stavber, S. Solvent-free iodination of organic molecules using the I₂/urea-H₂O₂ reagent system. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 699-707.
387. Kataoka, K.; Hagiwara, Y.; Midorikawa, K.; Suga, S.; Yoshida, J.-i. Practical Electrochemical Iodination of Aromatic Compounds. *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12, 1130-1136.
388. Glick, S. M.; Berson, S. A.; Yalow, R. S.; Roth, J. Immunoassay of Human Growth Hormone in Plasma. *Nature* **1963**, 199, 784-787.
389. Patil, B. R.; Bhusare, S. R.; Pawar, R. P.; Vibhute, Y. B. Iodine and iodic acid: an efficient reagent combination for iodination of aryl hydroxy ketones. *Tetrahedron Lett.* **2005**, 46, 7179-7181.
390. Friedel, C.; Crafts, J.-M. Sur une nouvelle méthode générale de synthèse d'hydrocarbures, d'acétones, etc. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **1877**, 84, 1392-1395.
391. Susz, B. P.; Chalandon, P. Etude de composés d'addition des acides de Lewis. IX. — Spectres d'absorption infrarouge des composés formés par la benzophénone et l'acétophénone avec BF₃, FeCl₃, ZnCl₂ et AlCl₃ et nature de la liaison oxygène-métal. *Helv. Chim. Acta* **1958**, 41, 1332-1341.
392. Yus, M.; Pastor, I. M.; Gomis, J. Lewis acid-promoted conjugate addition of functionalised organolithium compounds to electrophilic olefins. *Tetrahedron* **2001**, 57, 5799-5805.
393. Olah, G. A.; Molnár, Á. *Hydrocarbon Chemistry*. John Wiley & Sons: 2003.
394. Santini, C. C.; Mathey, F. Direct Friedel-Crafts Acylation of Phosphole P-Mo(Co)₅ Complexes - a Simple Access to Functional Phospholes. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 467-469.
395. Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, 29, 2176-2179.
396. Shi, J. M.; Zhang, X. P.; Neckers, D. C. Xanthenes - Fluorone derivatives. 1. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 4418-4421.

397. Hoult, J. R. Pharmacological and biochemical actions of sulphasalazine. *Drugs* **1986**, 32 Suppl 1, 18-26.
398. Zakrzewski, A.; Neckers, D. C. Bleaching Products of Rose-Bengal under Reducing Conditions. *Tetrahedron* **1987**, 43, 4507-4512.
399. Saylor, J. Photobleaching of disodium fluorescein in water. *Exp. Fluids* **1995**, 18, 445-447.
400. Šebej, P.; Wintner, J.; Müller, P.; Slanina, T.; Al Anshori, J.; Antony, L. A. P.; Klán, P.; Wirz, J. Fluorescein Analogues as Photoremovable Protecting Groups Absorbing at ~520 nm. *J. Org. Chem.* **2012**.
401. Klonis, N.; Sawyer, W. H. Effect of solvent-water mixtures on the prototropic equilibria of fluorescein and on the spectral properties of the monoanion. *Photochem. Photobiol.* **2000**, 72, 179-85.
402. Li, S.-C.; Diebold, U. Reactivity of TiO₂ Rutile and Anatase Surfaces toward Nitroaromatics. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 132, 64-66.
403. Tamura, Z.; Terada, R.; Ohno, K.; Maeda, M. Features of Phenolsulfonphthalein and Phenolphthalein Substituted at All *Ortho*-Positions of Phenols with Bromine. *Anal. Sci.* **1999**, 15, 339-342.
404. Brenzovich Jr, W. E.; Odell, M. D.; Soares, J. P.; Abelt, C. J. Structure and properties of some cresolphthalein derivatives. *Dyes Pigments* **2003**, 59, 251-261.
405. McHedlov-Petrosyan, N. O.; Vodolazkaya, N. A.; Surov, Y. N.; Samoylov, D. V. 2,4,5,7-Tetranitrofluorescein in solutions: novel type of tautomerism in hydroxyxanthene series as detected by various spectral methods. *Spectrochim. Acta A* **2005**, 61, 2747-2760.
406. Olofsson, B.; Wijtmans, R.; Somfai, P. Synthesis of N-H vinylaziridines: a comparative study. *Tetrahedron* **2002**, 58, 5979-5982.
407. Lepore, S. D.; He, Y. Use of Sonication for the Coupling of Sterically Hindered Substrates in the Phenolic Mitsunobu Reaction. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8261-8263.
408. Mitsunobu, O.; Yamada, M. Preparation of Esters of Carboxylic and Phosphoric Acid *via* Quaternary Phosphonium Salts. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1967**, 40, 2380-2382.
409. Mitsunobu, O. The Use of Diethyl Azodicarboxylate and Triphenylphosphine in Synthesis and Transformation of Natural Products. *Synthesis* **1981**, 1981, 1-28.
410. But, T. Y.; Toy, P. H. The Mitsunobu reaction: origin, mechanism, improvements, and applications. *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 1340-55.
411. Shieh, W.-C.; Dell, S.; Repič, O. Nucleophilic Catalysis with 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) for the Esterification of Carboxylic Acids with Dimethyl Carbonate. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 2188-2191.
412. Dickstein, J. S.; Mulrooney, C. A.; O'Brien, E. M.; Morgan, B. J.; Kozlowski, M. C. Development of a Catalytic Aromatic Decarboxylation Reaction. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2441-2444.
413. Goldstei, S.; Mcnelis, E. Migrations in Oxidations of Trisubstituted Anilines. *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 183-185.
414. Corma, A.; Serna, P. Chemoselective hydrogenation of nitro compounds with supported gold catalysts. *Science* **2006**, 313, 332-334.
415. Biradar, A. V.; Kotbagi, T. V.; Dongare, M. K.; Umbarkar, S. B. Selective N-oxidation of aromatic amines to nitroso derivatives using a molybdenum acetylide oxo-peroxo complex as catalyst. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3616-3619.
416. Hamon, F.; Djedaini-Pilard, F.; Barbot, F.; Len, C. Azobenzenes-synthesis and carbohydrate applications. *Tetrahedron* **2009**, 65, 10105-10123.
417. Grirrane, A.; Corma, A.; Garcia, H. Gold-Catalyzed Synthesis of Aromatic Azo Compounds from Anilines and Nitroaromatics. *Science* **2008**, 322, 1661-1664.
418. Zhang, C.; Jiao, N. Copper-Catalyzed Aerobic Oxidative Dehydrogenative Coupling of Anilines Leading to Aromatic Azo Compounds using Dioxxygen as an Oxidant. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 6174-6177.
419. Zhang, L. J.; Xia, J.; Li, Q. H.; Li, X. H.; Wang, S. W. Fast Synthesis of Hydrazine and Azo Derivatives by Oxidation of Rare-Earth-Metal-Nitrogen Bonds. *Organometallics* **2011**, 30, 375-378.
420. Hu, L.; Cao, X. Q.; Chen, L.; Zheng, J. W.; Lu, J. M.; Sun, X. H.; Gu, H. W. Highly efficient synthesis of aromatic azos catalyzed by unsupported ultra-thin Pt nanowires. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 3445-3447.

421. Moore, R. E.; Furst, A. Reductions with Hydrazine Hydrate Catalyzed by Raney Nickel .3. Effect of the Catalyst on the Reduction of 2,2'-Dinitrobiphenyl. *J. Org. Chem.* **1958**, 23, 1504-1506.
422. Hutchins, R. O.; Lamson, D. W.; Rua, L.; Milewski, C.; Maryanof, B. Reduction of Aromatic Nitro Compounds with Sodium Borohydride in Dimethyl Sulfoxide or Sulfolane - Synthesis of Azo or Azoxy Derivatives. *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 803-806.
423. Gowda, S.; Abiraj, K.; Gowda, D. C. Reductive cleavage of azo compounds catalyzed by commercial zinc dust using ammonium formate or formic acid. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1329-1331.
424. Gowda, S.; Gowda, D. C. Application of hydrazinium monoformate as new hydrogen donor with Raney nickel: a facile reduction of nitro and nitrile moieties. *Tetrahedron* **2002**, 58, 2211-2213.
425. Srinivasa, G. R.; Abiraj, K.; Gowda, D. C. Facile synthesis of azo compounds from aromatic nitro compounds using magnesium and triethylammonium formate. *Aust. J. Chem.* **2004**, 57, 609-610.
426. Wang, Z.; Skerlj, R. T.; Bridger, G. J. Regioselective synthesis of aryl hydrazides by palladium-catalyzed coupling of t-butylcarbazate with substituted aryl bromides. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 3543-3546.
427. Kwong, F. Y.; Klapars, A.; Buchwald, S. L. Copper-catalyzed coupling of alkylamines and aryl iodides: An efficient system even in an air atmosphere. *Org. Lett.* **2002**, 4, 581-584.
428. Lim, Y. K.; Lee, K. S.; Cho, C. G. Novel route to azobenzenes via Pd-catalyzed coupling reactions of aryl hydrazides with aryl halides, followed by direct oxidations. *Org. Lett.* **2003**, 5, 979-982.
429. Zollinger, H. *Color Chemistry*. John Wiley & Sons: 2004.
430. Zollinger, H. Azo Coupling Reactions. In *Diazo Chemistry I*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2004; pp 346-383.
431. Garcia-Amoros, J.; Nonell, S.; Velasco, D. Photo-driven optical oscillators in the kHz range based on push-pull hydroxyazopyridines. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4022-4024.
432. Cygler, M.; Przybylska, M.; Eloffson, R. M. The Crystal-Structure of Benzenediazonium Tetrafluoroborate, C₆H₅N₂⁺.Bf₄⁻. *Can. J. Chem.* **1982**, 60, 2852-2855.
433. Galli, C. Radical reactions of arenediazonium ions: An easy entry into the chemistry of the aryl radical. *Chem. Rev.* **1988**, 88, 765-792.
434. Zollinger, H. Diazotization of Amines and Dediazonation of Diazonium Ions. In *The Chemistry of Amino, Nitroso, Nitro and Related Groups*, John Wiley & Sons, Ltd: 2003; pp 627-663.
435. Roglans, A.; Pla-Quintana, A.; Moreno-Mañas, M. Diazonium Salts as Substrates in Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 4622-4643.
436. Yu, S. S. C.; Downard, A. J. Photochemical Grafting and Activation of Organic Layers on Glassy Carbon and Pyrolyzed Photoresist Films. *Langmuir* **2007**, 23, 4662-4668.
437. Tour, J. M. Transition to organic materials science. Passive, active, and hybrid nanotechnologies. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 7477-7496.
438. Kosynkin, D. V.; Tour, J. M. Phenylene ethynylene diazonium salts as potential self-assembling molecular devices. *Org. Lett.* **2001**, 3, 993-995.
439. Doyle, M. P.; Bryker, W. J. Alkyl Nitrite-Metal Halide Deamination Reactions .6. Direct Synthesis of Arenediazonium Tetrafluoroborate Salts from Aromatic-Amines, Tert-Butyl Nitrite, and Boron-Trifluoride Etherate in Anhydrous Media. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1572-1574.
440. Filimonov, V. D.; Trusova, M.; Postnikov, P.; Krasnokutskaya, E. A.; Lee, Y. M.; Hwang, H. Y.; Kim, H.; Chi, K.-W. Unusually Stable, Versatile, and Pure Arenediazonium Tosylates: Their Preparation, Structures, and Synthetic Applicability. *Org. Lett.* **2008**, 10, 3961-3964.
441. Zhang, Q. Z.; Zhang, S. S.; Liu, X. M.; Zhang, J. M. Synthesis of solid arenediazonium nitrates under nonaqueous condition. *Synthetic Commun.* **2001**, 31, 1243-1247.
442. Suryadevara, P. K.; Olepu, S.; Lockman, J. W.; Ohkanda, J.; Karimi, M.; Verlinde, C. L. M. J.; Kraus, J. M.; Schoepe, J.; Van Voorhis, W. C.; Hamilton, A. D.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H. Structurally Simple Inhibitors of Lanosterol 14 α -Demethylase Are Efficacious In a Rodent Model of Acute Chagas Disease. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 3703-3715.
443. Pfister, R.; Ihalainen, J.; Hamm, P.; Kolano, C. Synthesis, characterization and applicability of three isotope labeled azobenzene photoswitches. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 3508-3517.

444. Han, S.-Y.; Kim, Y.-A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, 60, 2447-2467.
445. Laras, Y.; Quelever, G.; Garino, C.; Pietrancosta, N.; Sheha, M.; Bihel, F.; Wolfe, M. S.; Kraus, J. L. Substituted thiazolamide coupled to a redox delivery system: a new gamma-secretase inhibitor with enhanced pharmacokinetic profile. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 612-8.
446. Joullie, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of amide bond formation. *Arkivoc* **2010**, 189-250.
447. Fathalla, M. F.; Khattab, S. N. Spectrophotometric Determination of pK(a)'s of 1-Hydroxybenzotriazole and Oxime Derivatives in 95% Acetonitrile-Water. *J. Chem. Soc. Pakistan* **2011**, 33, 324-332.
448. Bamfield, P.; Quan, P. M. New Synthesis of Biaryls from Aryl Halides Using Aqueous Alkaline Sodium Formate with Palladium on Charcoal and Surfactant as Catalyst. *Synthesis* **1978**, 537-538.
449. Ikeda, T.; Aprahamian, I.; Stoddart, J. F. Blue-colored donor-acceptor [2]rotaxane. *Org. Lett.* **2007**, 9, 1481-1484.
450. Mukhopadhyay, S.; Rothenberg, G.; Gitis, D.; Wiener, H.; Sasson, Y. Kinetics and mechanism of heterogeneous palladium-catalyzed coupling reactions of chloroaryls in water. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 2481-2484.
451. Cellier, P. P.; Spindler, J. F.; Taillefer, M.; Cristau, H. J. Pd/C-catalyzed room-temperature hydrodehalogenation of aryl halides with hydrazine hydrochloride. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 7191-7195.
452. Murata, M.; Oyama, T.; Watanabe, S.; Masuda, Y. Palladium-Catalyzed Borylation of Aryl Halides or Triflates with Dialkoxyborane: A Novel and Facile Synthetic Route to Arylboronates. *J. Org. Chem.* **1999**, 65, 164-168.
453. Zhu, L.; Duquette, J.; Zhang, M. An Improved Preparation of Arylboronates: Application in One-Pot Suzuki Biaryl Synthesis†. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 3729-3732.
454. Maddaford, S. P.; Keay, B. A. Scope and Limitations of the Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reaction of in situ Generated Organoboranes with Aryl and Vinyl Halides. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 6501-6503.
455. Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 20, 3437-3440.
456. Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective synthesis of arylated (E)-alkenes by the reaction of alk-1-enylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 866-867.
457. Li, J. H.; Liang, Y.; Wang, D. P.; Liu, W. J.; Xie, Y. X.; Yin, D. L. Efficient Stille cross-coupling reaction catalyzed by the Pd(OAc)₂/Dabco catalytic system. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2832-2834.
458. Fitzpatrick, J.; Meyer, T. A.; O'Neill, M. E.; Williams, D. L. H. Comparison of the reactivity of nine nitrous acid scavengers. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 927-932.
459. Hughes, E. D.; Ingold, C. K.; Ridd, J. H. 13. Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part I. Principles, background, and method for the kinetic study of diazotisation. *J. Chem. Soc.* **1958**, 58-65.
460. Hughes, E. D.; Ingold, C. K.; Ridd, J. H. 14. Nitrosation, diazotisation, and deamination. Part II. Second- and third-order diazotisation of aniline in dilute perchloric acid. *J. Chem. Soc.* **1958**, 65-69.
461. Ridd, J. H. Nitrosation, diazotisation, and deamination. *Chem. Soc. Rev.* **1961**, 15, 418-441.
462. Williams, D. L. H. *Nitrosation*. Cambridge University Press: Cambridge, 1988.
463. Ridd, J. H. *J. Soc. Dyers Colour.* **1965**, 355.
464. Wu, Z.; Glaser, R. Ab initio study of the S_N1Ar and S_N2Ar reactions of benzenediazonium ion with water. On the conception of "unimolecular dediazotiation" in solvolysis reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10632-10639.
465. Tunçel, M.; Serin, S. Synthesis and characterization of new azo-linked Schiff bases and their cobalt(II), copper(II) and nickel(II) complexes. *Transition Met. Chem.* **2006**, 31, 805-812.
466. Zollinger, H.; Wittwer, C. Die Kinetik der Kupplungsreaktion: Diskussion und Anwendungen der kinetischen Reaktionsgleichung. *Helv. Chim. Acta* **1952**, 35, 1209-1223.

467. Wittwer, C.; Zollinger, H. Der Zustand von Diazoverbindungen bei verschiedenem pH. Azokupplungen in stark alkalischem Medium. *Helv. Chim. Acta* **1954**, 37, 1954-1968.
468. Zollinger, H. Nitrogen as Leaving Group: Dediazoniations of Aromatic Diazonium Ions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1978**, 17, 141-150.
469. Szele, I.; Zollinger, H. Azo coupling reactions structures and mechanisms. In Springer Berlin / Heidelberg: 1983; Vol. 112, pp 1-66.
470. Diener, H.; Güleç, B.; Skrabal, P.; Zollinger, H. Diazotisation Mechanism of Heteroaromatic Amines. Diazotisation of 2-aminothiazole as an equilibrium. *Helv. Chim. Acta* **1989**, 72, 800-805.
471. Panchartek, J.; Sterba, V.; Vorlicék, J.; Vecera, M. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1968**, 33, 894.
472. Kaminski, R.; Lauk, U.; Skrabal, P.; Zollinger, H. Mechanism of Azo Coupling Reactions XXXIII. pH-dependence and micromixing effects on the product distribution of couplings with 6-amino-4-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid. Evidence for N-coupling of a naphthylamine derivative. *Helv. Chim. Acta* **1983**, 66, 2002-2017.
473. Zollinger, H. HYDROGEN ISOTOPE EFFECTS IN AROMATIC SUBSTITUTION REACTIONS. *Adv. Phys. Org. Chem.* **1964**, 2, 163-200.
474. Gordon, P. F.; Gregory, P. Organic Chemistry in Colour. In Springer: 1983; pp 96-108.
475. Kim, Y. D.; Cho, J. H.; Park, C. R.; Choi, J.-H.; Yoon, C.; Kim, J. P. Synthesis, application and investigation of structure-thermal stability relationships of thermally stable water-soluble azo naphthalene dyes for LCD red color filters. *Dyes Pigments* **2011**, 89, 1-8.
476. Sayed, M. B.; Ibrahim, E. H. M.; Al-Emadi, I. M. Thermal decomposition stages of the azo linkages in novel azo phosphorus compounds. A correlative DTA study. *Thermochim. Acta* **1992**, 198, 21-31.
477. Sakong, C.; Kim, Y. D.; Choi, J.-H.; Yoon, C.; Kim, J. P. The synthesis of thermally-stable red dyes for LCD color filters and analysis of their aggregation and spectral properties. *Dyes and Pigments* **2011**, 88, 166-173.
478. Bello, K. A.; Shen, K.; Zhao, D.; Esancy, M.; Freeman, H. Dyes based on 5,10-dihydrophenolphosphazine. Part I: Disazo direct dyes. *Dyes Pigments* **2000**, 46, 121-128.
479. Szadowski, J.; Niewiadomski, Z.; Wojciechowski, K. Direct urea-based dyes derived from diamines with increased solubilities. *Dyes Pigments* **2001**, 50, 87-92.
480. Gong, G. L.; Gao, X.; Wang, J. L.; Zhao, D. F.; Freeman, H. S. Trisazo direct black dyes based on nonmutagenic 3,3'-disubstituted benzidines. *Dyes Pigments* **2002**, 53, 109-117.
481. Akerman, D.; Phillips, D. A. S.; Taylor, J. A. Interaction of oxidative bleach containing detergents with dyes. Part 1: Preparation and resistance of 1-amino-2-aryazonaphthalene-4-sulphonic acid dyes to hydrogen peroxide and m-chloroperbenzoic acid. *Dyes Pigments* **2003**, 59, 285-292.
482. Smith, B.; Berger, R.; Freeman, H. S. High affinity, high efficiency fibre-reactive dyes. *Color. Technol.* **2006**, 122, 187-193.
483. Wang, J. L.; Freeman, H. S.; D Claxton, L. Synthesis and mutagenic properties of direct dyes from 4,4'-diamino-p-terphenyl and 4,4'-diamino-p-quaterphenyl. *Color. Technol.* **2007**, 123, 39-45.
484. Bone, J. A.; Le, T. T.; Phillips, D. A. S.; Taylor, J. A. One-bath dyeing of polyester/cotton blends with disperse and bis-3-carboxypyridinium-s-triazine reactive dyes. Part 2: Application of substantive reactive dyes to cotton at 130 degrees C and neutral pH. *Color. Technol.* **2008**, 124, 117-126.
485. Morris, K. F.; Lewis, D. M.; Broadbent, P. J. Design and application of a multifunctional reactive dye capable of high fixation efficiency on cellulose. *Color. Technol.* **2008**, 124, 186-194.
486. Wang, L. M.; Pan, X. J.; Wang, F.; Yang, L. B.; Liu, L. Structure-properties relationships investigation on the azo dyes derived from benzene sulfonamide intermediates. *Dyes Pigments* **2008**, 76, 636-645.
487. Song, D. H.; Kim, J. P. Effect of transition moments and orientational behavior of dichroic dyes on the optical anisotropy of poly(vinyl alcohol) polarizing films. *Dyes Pigments* **2009**, 80, 219-225.
488. Chang, J. B.; Yuk, S. B.; Park, J. S.; Kim, J. P. Dichroic and spectral properties of anthraquinone-based azo dyes for PVA polarizing film. *Dyes Pigments* **2012**, 92, 737-744.

489. Wojciechowski, K.; Wyrebak, A.; Gumulak, J. Direct dyes derived from iso- and terephthalic acids. *Dyes Pigments* **2003**, 56, 99–109.
490. Naicker, K. P.; Jiang, S.; Lu, H.; Ni, J.; Boyer-Chatenet, L.; Wang, L.-X.; Debnath, A. K. Synthesis and anti-HIV-1 activity of 4-[4-(4,6-bisphenylamino-triazin-2-ylamino)-5-methoxy-2-methylphenylazo]-5-hydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid and its derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 1215-1220.
491. Landini, D.; Maia, A.; Podda, G. Non-Hydrated Anion Transfer from the Aqueous to the Organic-Phase - Enhancement of Nucleophilic Reactivity in Phase-Transfer Catalysis. *J. Org. Chem.* **1982**, 47, 2264-2268.
492. Marriott, J. H.; Barber, A. M. M.; Hardcastle, I. R.; Rowlands, M. G.; Grimshaw, R. M.; Neidle, S.; Jarman, M. Synthesis of the farnesyl ether 2,3,5-trifluoro-6-hydroxy-4-[(E,E)-3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trien-1-yloxy]nitrobenzene, and related compounds containing a substituted hydroxytrifluorophenyl residue: novel inhibitors of protein farnesyltransferase, geranylgeranyltransferase I and squalene synthase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 4265-4278.
493. Tanaka, K.; Sano, K. I.; Katoh, T.; Iwata, S.; Nemoto, K.; Kurushima, T. Proton- and metal cation-enhanced excited state intramolecular proton transfers of 2-(2-hydroxyfluorophenyl)benzoxazole having imidazole moiety. *J. Fluorine Chem.* **2006**, 127, 1073-1078.
494. Tanaka, K.; Kurushima, T.; Iwata, S.; Shimada, S. Fluorescent behavior of 2-(3,4,5,6-tetrafluoro-2-hydroxyphenyl)imidazo[1,2-a]pyridine in the presence of metal perchlorate. *J. Heterocycl. Chem.* **2007**, 44, 303-307.
495. Bilski, P.; Holt, R. N.; Chignell, C. F. Premicellar aggregates of Rose Bengal with cationic and zwitterionic surfactants. *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, 110, 67-74.
496. Abbott, L. C.; Batchelor, S. N.; Oakes, J.; Smith, J. R. L.; Moore, J. N. Spectroscopic studies of the intermolecular interactions of a bis-azo dye, direct blue 1, on di- and trimerization in aqueous solution and in cellulose. *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 13726–13735.
497. Coan, K. E. D.; Shoichet, B. K. Stoichiometry and physical chemistry of promiscuous aggregate-based inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 9606-9612.
498. Porath, J.; Flodin, P. Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* **1959**, 183, 1657-9.
499. Freeman, H. S.; Williard, C. S.; Hsu, W. N. Purification Procedures for Synthetic Dyes .1. Dry Column Chromatography. *Dyes Pigments* **1986**, 7, 397–405.
500. Bae, J. S.; Freeman, H. S.; El-Shafei, A. Metallization of non-genotoxic direct dyes. *Dyes Pigments* **2003**, 57, 121–129.
501. Patel, D. R.; Patel, K. C. Synthesis, antimicrobial activity and application of some novel quinazolinone based monoazo reactive dyes on various fibres. *Dyes Pigments* **2011**, 90, 1–10.
502. Freeman, H. S.; Williard, C. S. Purification Procedures for Synthetic Dyes .2. Countercurrent Chromatography. *Dyes Pigments* **1986**, 7, 407–417.
503. Huttner, W. B.; Schiebler, W.; Greengard, P.; Decamilli, P. Synapsin-I (Protein-I), a Nerve Terminal-Specific Phosphoprotein .3. Its Association with Synaptic Vesicles Studied in a Highly Purified Synaptic Vesicle Preparation. *J. Cell Biol.* **1983**, 96, 1374-1388.
504. Kish, P. E.; Ueda, T. Glutamate Accumulation into Synaptic Vesicles. *Methods Enzymol.* **1989**, 174, 9-25.
505. Takamori, S.; Holt, M.; Stenius, K.; Lemke, E. A.; Gronborg, M.; Riedel, D.; Urlaub, H.; Schenck, S.; Brugger, B.; Ringler, P.; Muller, S. A.; Rammner, B.; Gräter, F.; Hub, J. S.; De Groot, B. L.; Mieskes, G.; Moriyama, Y.; Klingauf, J.; Grubmuller, H.; Heuser, J.; Wieland, F.; Jahn, R. Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **2006**, 127, 831-846.
506. Lu, Y. X.; Shi, T.; Wang, Y.; Yang, H. Y.; Yan, X. H.; Luo, X. M.; Jiang, H. L.; Zhu, W. L. Halogen Bonding-A Novel Interaction for Rational Drug Design? *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 2854-2862.
507. Carreon, J. R.; Roberts, M. A.; Wittenhagen, L. M.; Kelley, S. O. Synthesis, characterization, and cellular uptake of DNA-binding rose bengal peptidoconjugates. *Org. Lett.* **2005**, 7, 99-102.
508. Amilhon, B.; El Mestikawy, S. VGLUT3 and the mechanism of vesicular synergy. *Med. Sci. (Paris)* **2008**, 24, 1009–1011.

509. Fredriksson, R.; Nordstrom, K. J. V.; Stephansson, O.; Hagglund, M. G. A.; Schioth, H. B. The solute carrier (SLC) complement of the human genome: Phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett.* **2008**, 582, 3811-3816.
510. Meyer, E. M.; Bryant, S. O.; Wang, R.-H. D.; Watson, R. J. Characterization of [³H]vesamicol binding in rat brain preparations. *Neurochem. Res.* **1993**, 18, 1067-1072.
511. Ogita, K.; Hirata, K.; Bole, D. G.; Yoshida, S.; Tamura, Y.; Leckenby, A. M.; Ueda, T. Inhibition of vesicular glutamate storage and exocytotic release by Rose Bengal. *J. Neurochem.* **2001**, 77, 34-42.
512. Mautner, H. G.; Merrill, R. E.; Currier, S. F.; Harvey, G. Interaction of Aromatic Dyes with the Coenzyme-a Binding-Site of Choline-Acetyltransferase. *J. Med. Chem.* **1981**, 24, 1534-1537.
513. Hopkins, S. C.; Vale, R. D.; Kuntz, I. D. Inhibitors of kinesin activity from structure-based computer screening. *Biochemistry* **2000**, 39, 2805-14.
514. Karlisch, S. J. D. Characterization of Conformational-Changes in (Na,K) Atpase Labeled with Fluorescein at the Active-Site. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1980**, 12, 111-136.
515. Neslund, G. G.; Miara, J. E.; Kang, J. J.; Dahms, A. S. Specific Interactions of Xanthene Dyes with Nucleotide-Binding Sites of Membrane Energy-Transducing Enzymes and Carriers. *Curr. Top. Cell. Regul.* **1984**, 24, 447-469.
516. Deweille, J. R.; Muller, M.; Lazdunski, M. Activation and Inhibition of Atp-Sensitive K⁺ Channels by Fluorescein Derivatives. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 4557-4563.
517. Cai, Z. W.; Sheppard, D. N. Phloxed B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 19546-19553.
518. Ogan, J. T.; Reifenberger, M. S.; Milanick, M. A.; Gatto, C. Kinetic characterization of Na,K-ATPase inhibition by Eosin. *Blood Cell. Mol. Dis.* **2007**, 38, 229-237.

Résumé : *Modulateurs du transport vésiculaire du glutamate : développement d'outils pharmacologiques et de diagnostic pour la maladie d'Alzheimer*

Les transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUTs) sont impliqués dans la recapture du glutamate du cytosol vers les vésicules présynaptiques. Depuis leurs caractérisations récentes en 2000, leurs implications dans plusieurs maladies neurodégénératives ont été démontrées. Ils jouent ainsi un rôle primordial dans la transmission nerveuse glutamatergique. Deux colorants naturels, le Rose Bengale et le Bleu Trypan, restent les meilleurs inhibiteurs connus à ce jour, avec respectivement des IC_{50} de 25 et 50 nM. Dans un premier temps, nous avons conçu et optimisé une série d'analogues basée sur le synthon Rose Bengale (inhibiteur non-compétitif). Ce travail a notamment permis de mettre en évidence l'effet des formes tautomères (quinone et lactone) sur l'inhibition des VGLUTs. Ainsi la forme quinonique, présente à pH physiologique, a été confirmée comme étant la seule capable de bloquer la recapture du glutamate. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la famille du Bleu Trypan (inhibiteur compétitif) et nous avons déterminé la structure minimale active avec l'objectif de rendre ces molécules plus « drug-like ». En effet, l'intérêt de ce projet est de développer de petites structures aisément radiomarquables pour une utilisation dans un contexte physio-pathologique

Mots-clés : VGLUT, glutamate, colorants, Rose Bengale, Bleu Trypan, structure-activité, neurotransmission.

Summary: *Modulators of vesicular glutamate transporters: development of pharmacological and diagnostic tools for Alzheimer's disease*

Vesicular glutamate transporters (VGLUTs) are involved in the recapture and storage of glutamate from cytol to secretory synaptic vesicles. Since their recent characterization in 2000, their implication in several neurodegenerative disorders have been demonstrated. They play a crucial role in glutamatergic neurotransmission. Natural dyes, such as Rose Bengal and Tryptan Blue are the best known inhibitors with IC_{50} values of 25 and 50 nM, respectively. Firstly, we designed and optimized a series of analogues based on the synthon Rose Bengal (non-competitive inhibitor). This work has especially enabled to highlight the effect of tautomeric forms (quinone and lactone) on the inhibition of VGLUTs. Thus, the quinone form, present at physiological pH, was confirmed as the only able to block the reuptake of glutamate. Secondly, we have been interested in the family of Trypan Blue (competitive inhibitor) and we determined the minimal active structure in order to render these molecules more "drug-like". Indeed, the interest of this project is to develop small structures easily radiomarkable to use in a physiopathological context.

Key words: VGLUT, glutamate, dyes, Rose Bengal, Trypan Blue, structure-activity, neurotransmission.